

54

NZAS-0027029

SVERIGE

(19) SE



# Översättning av europeisk patenttskrift (T 3)

0548228 1998:47

(87) Europeiskt publ nr

(86) Europeiskt ansökningsnr 91916986.2

(51) Internationell klass

<sup>6</sup>

**PATENTVERKET**

C12N 9/20 C12N 15/55 C11D 3/386 C12N 5/14

(86) Ingivningsdag för ansökan  
om europeiskt patent  
**91-09-13**

(45) Meddelandedatum för  
det europeiska patentet  
**98-08-12**

(60) Stamansökans nummer

(24) Löpdag

(30) Prioritetsuppgifter

**90-09-13 DK 219490**  
**90-09-13 DK 219690**

**90-09-13 DK 219590**

(54) Benämning  
**Lipasvarianter**

(73) Patenthavare

**NOVO NORDISK A/S, 2880 Bagsvaerd DK**

(72) Uppfönnare

**A. SVENDSEN, DK-3460 Birkeroed DK**  
**I. CLAUSEN, DK-2920 Charlottenlund DK**  
**S. PATKAR, DK-2800 Lyngby DK**  
**E. GORMSEN, DK-2830 Virum DK**

(84) Designerade stater

**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

Siffrorna inom parentes anger internationell identificeringskod, INID-kod

**NZAS-0027030**

LIPASVARIANTER

## UPPFINNINGENS OMRÄDE

Föreliggande uppfinding hänför sig till nya lipasenzymvarianter med förbättrade egenskaper, DNA-konstruktioner som kodar för expressionen av varianterna, värd-

5 celler som uppvisar förmåga att uttrycka varianterna från DNA-konstruktionerna och till ett förfarande för framställning av varianterna genom odling av nämnda värdceller.

## 10 BAKGRUND TILL UPPFINNINGEN

Tillkomsten och utvecklingen av rekombinanta DNA-metoder har haft ett stort inflytande på området proteinkemi. Man räknar med att dessa metoder möjliggör framställningen av peptider och proteiner, såsom enzymer, i enlighet med specifika kriterier, vilket således möjliggör framställning av föreningar med önskade egenskaper.

15 Beroende på tillgängligheten av sådana metoder har det visat sig vara möjligt att framställa enzymer med önskade aminosyrsekvenser och ansenlig forskning har ägnats åt detta.

20 Primärstrukturen för ett antal lipaser har bestämts och beskrivits i litteraturen (Boel et al., *Lipids* **23**, 701-706 (1988), de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta* **671**, 129-138 (1981), Winkler et al., *Nature* **343**, 771-774 (1990)). Dessutom har också tertiärstrukturen för ett mer begränsat antal lipaser klargjorts (Winkler et al., *Nature* **343**, 771-774 (1990), Brady et al., *Nature* **343**, 767-770 (1990) J.D. Schrag et al., *Nature* 351, 1991, sid. 761-764). Från dessa undersökningar verkar det som lipaser ha vissa strukturella särdrag gemensamma men å andra sidan verkar större strukturella variationer också existera bland lipaserna.

## SAMMANFATTNING AV UPPFINNINGEN

Ytterligare undersökningar har nu visat att förbättrade egenskaper för lipaser kan erhållas genom en eller flera specifika mutationer i den DNA-sekvens som uttrycker ett specifikt lipas, vilka leder till lipasvarianter som uppvisar sådana förbättrade egenskaper.

Således hänför sig föreiggande uppfinning enligt en aspekt till en lipasvariant från ett moderlipas innehållande en trypsinliknande katalytisk triad innehållande en aktiv serin lokaliseras i en väsentligen hydrofobisk, långsträckt bindningsficka hos lipasmolekylen, vari den elektrostatiska laddningen och/eller hydrofobiciteten i lipidkontaktzonen hos moderlipaset ändras genom deletion eller substitution av en eller flera negativt laddade aminosyrarester med neutral(a) eller positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom substitution av en eller flera neutrala aminosyrarester med positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom deletion eller substitution av en eller flera hydrofila aminosyrarester med hydrofob(a) aminosyrarest(er). För enkelhets skull benämns denna lipasvariant härefter lipasvariant I.

I föreiggande text avser termen "trypsinliknande" att indikera att moderlipaset innehållar en katalytisk triad vid det aktiva säte som motsvarar det för trypsin, d.v.s. aminosyrorna Ser, His och en av Asp, Glu, Asn och Gln. Vissa lipaser kan också innehålla en på ytan ej basparad region som täcker den aktiva serinen när lipaset förelijger i inaktiv form (ett exempel på ett sådant lipas beskrivs av Brady et al., Nature 343, 1990, sid. 767-770). När lipaset aktiveras ändras den ej basparade regionen för exponering av rester vid det aktiva sätet, varvid en yta med ökad ythydrofobicitet skapas vilken interagerar med lipidsubstratet vid eller under hydrolysin. För föreiggande ändamål benämns denna yta "lipidkontaktzon", vilken avser att innehålla aminosyrarester vilka är lokaliseraade inom eller utgör del av denna yta. Dessa rester kan medverka vid lipasinteraktion med substratet vid el-

ler under hydrolysering när lipaset hydrolyserar triglycerider från lipidfasen vid aktivering genom kontakt med lipidytan. Under hydrolysering av triglyceriderna bildas fettsyror och mono- och diglycerider i varierande mängder. En an-  
5 ledning till att ändra den elektrostatiska laddningen och/eller hydrofobiciteten för lipidkontaktzonen genom mutation av lipaset i denna zon är att fettsyrorna som bildas under hydrolysering kan bibehållas i lipidfasen, varvid det således bildas en negativt laddad yta. När lipaset  
10 används för tvättändamål, kan negativt laddade detergen- ter bilda negativa laddningar på lipidytan. Således är det möjligt, genom framställning av lipasvarianter vilka  
är mindre negativt laddade och/eller mer hydrofoba, att erhålla lipaser med andra specificiteter och/eller för-  
15 bättrade egenskaper.

Föreliggande uppföring hänför sig också till en DNA-konstruktion innehållande en DNA-sekvens som kodar för en lipasvariant som indikerats ovan, en rekombinant expressionsvektor bärande DNA-konstruktionen, en cell  
20 transformeras med DNA-konstruktionen eller expressions- vektorn och till ett förfarande för framställning av en lipasvariant enligt uppföringen genom odling eller till- växt av nämnda cell under förhållanden som gynnar fram-  
ställningen av lipasvarianten, varefter lipasvarianten  
25 utvinns från odlingen.

Uppföringen hänför sig dessutom till en detergent- tillsats innehållande en lipasvariant enligt uppföringen, eventuellt i form av ett granulat som inte dammar, stabiliseras i vätska eller skyddat enzym och till en de-  
30 tergentkomposition innehållande lipasvariant enligt upp- föringen.

#### DETALJERAD BESKRIVNING AV UPPFÖRINGEN

I föreliggande beskrivning och krav används följande  
35 förkortningar:

Aminosyror

|    |                        |
|----|------------------------|
|    | A = Ala = Alanin       |
|    | V = Val = Valin        |
|    | L = Leu = Leucin       |
| 5  | I = Ile = Isoleucin    |
|    | P = Pro = Prolin       |
|    | F = Phe = Fenykalanin  |
|    | W = Trp = Tryptofan    |
|    | M = Met = Metionin     |
| 10 | G = Gly = Glycin       |
|    | S = Ser = Serin        |
|    | T = Thr = Treonin      |
|    | C = Cys = Cystein      |
|    | Y = Tyr = Tyrosin      |
| 15 | N = Asn = Asparagin    |
|    | Q = Gln = Glutamin     |
|    | D = Asp = Asparginsyra |
|    | E = Glu = Glutaminsyra |
|    | K = Lys = Lysin        |
| 20 | R = Arg = Arginin      |
|    | H = His = Histidin     |

Vid beskrivning av lipasvarianter enligt uppfindingen används följande nomenklatur för enkelhetens skull:

25 Ursprunglig(a) aminosyra(syror): position(er): substituerad(e) aminosyra(syror).

Enligt denna nomenklatur visas exempelvis substitution av glycin med glutaminsyra i position 195 som:

Gly 195 Glu eller G195E

30 en deletion av glycin i samma position visas som:

Gly 195\* eller G195\*

och insättning av ytterligare en aminosyrarest, såsom lysin, visas som:

Gly 195 GlyLys eller G195GK

När ett specifikt lipas har utsatts för en "deletion" i förhållande till andra lipaser och en insättning görs i en sådan position indikeras detta som:

\* 36 Asp eller \*36D

5 för insättning av en asparginsyra i position 36.

Multipla mutationer separeras genom plustecken,  
d.v.s.:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu eller R170Y+G195E

vilket avser mutationer i positionerna 170 och 195, var-  
10 vid arginin och glycin substitueras med tyrosin respekti-  
ve glutaminsyra.

Företrädesvis är lipasvariant I enligt uppförningen ett lipas i vilket en eller flera glutaminsyra- eller asparginsyrarester i lipidkontaktzonen hos lipaset substi-  
15 tuerats med glutamin, aspargin, alanin, leucin, valin,  
serin, treonin, glycin eller arginin.

Fastän moderlipaset kan erhållas från ett flertal olika källor, såsom däggdjurslipaser, t.ex. pankreatiska, gastriska, hepatiska eller lipoproteinlipaser, är det  
20 vanligt föredraget att lipaset är ett mikrobiellt lipas. Som sådant kan moderlipaset väljas från jäst, t.ex. lipas från Candida, bakterier, t.ex. lipaser från Pseudomonas, eller fungi, t.ex. lipaser från Humicola- eller Rhizomu-  
cor. Det är speciellt föredraget att välja moderlipaset  
25 från en grupp av strukturellt homologa lipaser.

I en föredragen utföringsform av lipasvariant I en-  
ligt uppförningen är moderlipaset ett Rhizomucor miehei-  
lipas, speciellt lipaset som beskrivs i EP 305 216. I  
denna utföringsform kan en eller flera negativt laddade  
30 aminosyrarester substitueras med en eller flera positivt  
laddade eller neutrala aminosyrarester enligt följande:

D91N,K,R,A,V,L,S,T;  
 D256N,K,R,A,V,L,S,T;  
 D226N,K,R,A,V,L,S,T;  
 D61N,K,R,A,V,L,S,T;  
 5 D113N,K,R,A,V,L,S,T;  
 E201Q,K,R,A,V,L,S,T;  
 D243N,K,R,A,V,L,S,T.

I en annan föredragen utföringsform av lipasvariant  
 10 I enligt uppföringen är moderlipaset ett *Humicola lanu-*  
*ginosa*-lipas, speciellt lipaset som framställts av *H. la-*  
*nuginosa*-stammen DSM 4106 (jämför EP 258 0068). I denna  
 utföringsform kan en eller flera negativt laddade amino-  
 syrarester substitueras med en eller flera neutrala eller  
 15 positivt laddade aminosyrarester enligt följande:

E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
 D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
 D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
 E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
 20 E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
 D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
 D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
 D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
 E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
 25 E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
 E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V  
 E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
 D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V; eller  
 E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V.

30 Speciellt föredragna substitutioner enligt uppförin-  
 ning är:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;  
 E87Q + D254N + E210Q;  
 35 D96N + E87Q + D254N:  
 R209A + E210A.

Alternativt kan en eller flera neutrala aminosyra-  
rester substitueras med en eller flera positivt laddade  
aminosyrarester enligt följande:

5                   T267K,R;  
                  S85K,R;  
                  T226K,R;  
                  N88K,R;  
                  N92K,R;  
                  I255K,R;  
10                   I202K,R  
                  L206K,R;  
                  L259K,R;  
                  V203K,R; eller  
                  L227K,R

15

Det bör noteras att *Humicola lanuginosa*-lipaset och *Rhizomucor miehei*-lipaset hör till samma grupp av lipaser. Detta tyder på att de totala tredimensionella strukturerna för de två lipaserna är mycket lika och har vi-  
20 sats vara mycket homologa genom röntgenkristallografi (en datormodell över *H. lanuginosa*-lipaset och *Rh. miehei*-li-  
paset visas i Fig. 1A och B respektive 2A och B, från  
vilka likheterna mellan de två lipasernas lipidkontaktzo-  
ner är mycket tydliga). Det är därför sannolikt att modi-  
25 fieringar av typen som indikerats för varje lipas också  
kommer att fungera för det andra lipaset.

Det bör noteras att vilka modifieringar som helst av aminosyrasekvensen som indikeras ovan, enligt uppfinning-  
en, för lipasvariant I kan kombineras med vilka andra mo-  
30 difieringar som helst som nämnts ovan eller vilka andra  
modifieringar som helst för varianterna II och III be-  
skrivna i WO 92/05249.

35                   Förfarande för framställning av lipasvarianter enligt  
                  uppfinningen

Flera metoder för introducering av mutationer i ge-  
ner är kända inom teknikområdet. Efter en kort diskussion

beträffande kloning av lipaskodande DNA-sekvenser kommer metoder för generering av mutationer vid specifika sätten i den lipaskodande sekvensen att diskuteras.

5 Kloning av en DNA-sekvens som kodar för ett lipas

DNA-sekvensen som kodar för ett moderlipas kan isoleras från vilken cell eller mikroorganism som helst, som framställer lipaset ifråga, genom olika metoder väl kända inom teknikområdet. Till att börja med bör genomiskt DNA och/eller cDNA-bibliotek framställas under användning av kromosomalt DNA eller budbärar-RNA från organismen som framställer lipaset som skall studeras. Sedan kan, om aminosyrasekvensen för lipaset ifråga är känd, homologa märkta oligonukleotidsonder syntetiseras och användas för 10 identifiering av lipaskodande kloner från ett genomiskt bibliotek av bakteriellt DNA eller från ett fungalt cDNA-bibliotek. Alternativt kan en märkt oligonukleotidsond innehållande sekvenser som är homologa med lipas från annan bakterie- eller fungsstam användas som en sond för 15 identifiering av lipaskodande kloner, varvid hybridisering- och tvättförhållanden av lägre stringens används.

Ytterligare en metod för identifiering av lipasproducerande kloner innehållar insättning av genomiska DNA-fragment i en expressionsvektor, såsom en plasmid, transformation av lipasnegativa bakterier med det resulterande genomiska DNA-biblioteket och sedan utspridning av de 20 transformerade bakterierna på agar innehållande ett substrat för lipas. Sådana bakterier som innehåller lipasbärande plasmid framställer kolonier omgivna av en halo av 25 klart agar, vilket beror på nedbrytning av substratet av utsöndrat lipas.

Alternativt kan DNA-sekvensen som kodar för enzymet framställas syntetiskt genom etablerade standardmetoder, t.ex. fosfoamiditmetoden som beskrivs av S.L. Beaucage 30 och M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, sid. 1859-1869, eller metoden som beskrivs av Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, sid. 801-805. Enligt fosfoamiditme-

toden framställs oligonukleotider, t.ex. i en automatiserad DNA-syntetisör, vilka renas, hybridiseras, ligeras och klonas i lämpliga vektorer. Slutligen kan DNA-sekvensen vara av blandat genomiskt och syntetiskt ursprung, av

5 blandat syntetiskt och cDNA ursprung eller av blandat genomiskt och cDNA ursprung, vilken framställts genom ligation av syntetiska, genomiska eller cDNA fragment (beroende på vad som är önskvärt), varvid fragmenten motsvarar olika delar av hela DNA-sekvensen, i enlighet med standardmetoder. DNA-sekvensen kan också framställas genom en polymeraskedjereaktion (PCR) med hjälp av specifika primers, såsom beskrivs i US 4 683 202 eller R.K. Saiki et al., Science 239, 11988, sid. 487-491.

15 Sätesriktad mutagenes för den lipaskodande sekvensen

När en lipaskodande DNA-sekvens har isolerats och önskvärda säten för mutation identifierats, kan mutationer introduceras med hjälp av syntetiska oligonukleotider. Dessa oligonukleotider innehåller nukleotidsekvenser som flankerar de önskade mutationssätena; mutanta nukleotider sätts in under oligonukleotidsyntes. I en specifik metod framställs ett enkelsträngat DNA-gap, som överbrygger den lipaskodande sekvensen, i en vektor som bär lipasgenen. Sedan hybridiseras den syntetiska nukleotiden, som bär den önskade mutationen, till en homolog del av det enkelsträngade DNA:t. Det återstående gapet fylls sedan igen med DNA-polymeras I (Klenow-fragment) och konstruktionen ligeras med hjälp av T4-ligas. Ett specifikt exempel på denna metod beskrivs i Morinaga et al., (1984, Biotechnology 2:646-639). US-patentet 4 760 025 av Estell et al., beviljat den 26 juli 1988, avslöjar introduktion av oligonukleotider, som kodar för multipla mutationer, genom utförande av mindre ändringar i kassetten. Emellertid kan ett till och med större mångfald mutationer introduceras vid vilken tidpunkt som helst genom Morinaga-metoden, eftersom ett mångfald oligonukleotider av varierande längder kan introduceras.

En annan metod för introducering av mutationer i lipaskodande sekvenser beskrivs i Nelson och Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, sid. 147-151. Den involverar den 3-stegsmetod där ett PCR-fragment genereras, vilket  
5 innehåller den önskade mutationen introducerad genom användning av en kemiskt syntetiserad DNA-sträng som en av ifrågavarande primers i PCR-reaktionerna. Från det PCR-genererade fragmentet kan ett DNA-fragment bärande mutationen isoleras genom klyvning med restriktionsendonukle-  
10 aser och därefter återinsättas i en expressionsplasmid (se också Fig. 3 och 4 där denna metod beskrivs ytterli-  
gare).

#### Expression av lipasvarianter

15 Enligt uppförningen kan en muterad lipaskodande sekvens, som är framställd genom metoder som beskrivits ovan eller genom vilken alternativ metod som helst känd inom teknikområdet, uttryckas i enzymform under användning av en expressionsvektor som typiskt innehåller reglersekvenser som kodar för en promotor, operator, ribosombindingssäte, translationsinitieringssignal och eventuellt en repressorgen eller olika aktivatorgener. För att möjliggöra utsöndringen av det uttryckta proteinet kan nukleotider som kodar för en "signalsekvens" sättas in före  
20 den lipaskodande sekvensen. För expression under ledning av reglersekvenser, kopplas en målgen som skall behandlas enligt uppförningen manövrerbart till reglersekvenserna i den rätta läsramen. Promotorsekvenser som kan sättas in i plasmidvektorer och kan stödja eller underlätta trans-  
25 skriptionen av den mutanta lipasgenen innehåller men be-  
gränsas inte till den prokaryota  $\beta$ -laktamaspromotorn (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731) och tac-promotorn (DeBoer, et al., 1983,  
30 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25). Ytterligare hänvisningar kan också hittas i "Useful proteins from recombi-  
35 nant bacteria" i Scientific American, 1980, 242:74-94.

Enligt en utföringsform transformeras *B. subtilis* med en expressionsvektor bärande det muterade DNA:t. Om expression skall äga rum i en utsöndrande mikroorganism, såsom *B. subtilis*, kan en signalsekvens följa transla-

5 tionsinitieringssignalen och föregå den intressanta DNA- sekvensen. Signalsekvensen verkar då för att transportera expressionsprodukten till cellväggen där den klyvs från produkten vid utsöndring. Såsom uttrycket "reglersekvenser" definieras ovan avser det att innefatta en signal- sekvens, då sådan förekommer.

I ett för närvarande föredraget förfarande för framställning av lipasvarianter enligt uppfinningen används en trådformig fungus som värdorganism. Ifrågavarande trådformiga fungus-värdorganism kan lämpligen vara en sådan som tidigare används som värd för framställning av rekombinanta proteiner, t.ex. en stam av *Aspergillus* sp., såsom *A. niger*, *A. nidulans* eller *A. oryzae*. Användning av *A. oryzae* vid framställningen av rekombinanta proteiner beskrivs utförligt i t.ex. EP 238 023.

20 För expression av lipasvarianter i *Aspergillus* föregås DNA-sekvensen som kodar för lipasvarianten av en promotor. Ifrågavarande promotor kan vara vilken DNA-sekvens som helst som har en större transkriptionell aktivitet i *Aspergillus* och kan erhållas från en gen som kodar för 25 ett extracellulärt eller intracellulärt protein, såsom ett amylas, ett glukoamylas, ett proteas, ett lipas, ett cellulas eller ett glykolytiskt enzym.

Exempel på lämpliga promotorer är sådana erhållna från gener som kodar för *A. oryzae* TAKA-amylas, *Rhizomucor miehei*-aspartanproteinas, *A. niger* neutral  $\alpha$ -amylas, *A. niger* syrastabil  $\alpha$ -amylas, *A. niger*-glukoamylas, *Rhizomucor miehei*-lipas, *A. oryzae* alkalisk proteas eller *A. oryzae*-triosfosfatisomeras.

30 Speciellt när värdorganismen är *A. oryzae* är en föredragen promotor för användning i förfarandet enligt föreliggande uppfinning *A. oryzae* TAKA-amylaspromotorn eftersom den uppvisar en större transkriptionell aktivitet

i A. oryzae. Sekvensen för ifrågavarande TAKA-amylaspro-motor visas i EP 238 023.

Terminerings- och polyadenyleringssekvenser kan lämpligen erhållas från samma källor som promotorn.

5 Metoderna som används för transformation av en fungal värdcell kan lämpligen utföras såsom beskrivs i EP 238 023.

För att försäkra sig om utsöndring av lipasvarianten från värdcellen kan man se till att DNA-sekvensen som kodar för lipasvarianten föregås av en signalsekvens, som kan vara en naturligt förekommande signalsekvens eller en funktionell del därav eller en syntetisk sekvens som åstadkommer utsöndring av proteinet från cellen. Speciellt kan signalsekvensen erhållas från en gen som kodar för ett Aspergillus sp.-amylas eller ett -glukoamylas, en gen som kodar för ett Rhizomucor miehei-lipas eller ett -proteas, eller en gen som kodar för ett Humicola-cellulas, ett -xylanas eller ett -lipas. Signalsekvensen erhålls företrädesvis från genen som kodar för A. oryzae 15 TAKA amylas, A. niger neutral  $\alpha$ -amylas eller A. niger sy-rastabil  $\alpha$ -amylas eller A. niger glukoamylas.

Mediet som används för odling av de transformatorade värdcellerna kan vara vilket traditionellt medium som helst vilket är lämpligt för tillväxt av Aspergillus-cellerna. Transformanterna är vanligtvis stabila och kan odlas i frånvaro av selektionstryck. Om transformanterna visar sig vara instabila kan emellertid en selektionsmarkör, vilken är introducerad i cellerna, användas för selektion.

30 Det mogna lipasproteinet, som utsöndrats från värdcellerna, kan lämpligen utvinnas från odlingsmediet genom välkända metoder innefattande separation av cellerna från mediet genom centrifugering eller filtrering och utfällning av proteinbaserade komponenter från mediet med hjälp 35 av ett salt, såsom ammoniumsulfat, följt av kromatografiska procedurer, såsom jonbyteskromatografi, affinitetskromatografi eller liknande.

Föreliggande uppföring hänför sig också till en detergenttillsats innehållande en lipasvariant enligt uppföringen, företrädesvis i form av ett granulat som inte dammar, en stabilisera vätska eller ett skyddat enzym.

5 Granulat som inte dammar kan framställas t.ex. enligt US 4 106 991 och US 4 661 452 (båda i namnet Novo Industri A/S) och kan eventuellt beläggas med hjälp av förfaranden som är kända inom området. Flytande enzymberedningar kan exempelvis stabiliseras genom tillsats av en polyol, såsom propylenglykol, ett socker eller en sockeralkohol, mjölksyra eller borsyra enligt etablerade metoder. Andra enzymstabilisatorer är väl kända inom teknikområdet. Skyddade enzymer kan framställas enligt metoden som avslöjas i EP 238 216.

15 Detergenttillsatsen kan lämpligen innehålla 0,02-200 mg enzymprotein per gram tillsats. Det förstas att detergenttillsatsen dessutom kan innehålla en eller flera andra enzymer, såsom ett proteas, celluläs, peroxidas eller amylas, som traditionellt innehållas i detergenttillsatser.

20

Enligt ytterligare en aspekt hänför sig uppföringen till en detergentkomposition innehållande en lipasvariant enligt uppföringen. Detergentkompositioner enligt uppföringen innehållar dessutom ytaktiva ämnen vilka kan vara av anjonisk, icke-jonisk, katjonisk, amfotär eller zwitterjonisk typ samt blandningar av dessa klasser av ytaktiva ämnen. Typiska exempel på lämpliga ytaktiva ämnen är linjära alkylbensensulfonater (LAS), alfa-olefinsulfonater (AOS), alkoholetoxisulfater (AEOS), alkoholetoxylater (AEO), alkylsulfater (AS), alkylpolyglykosider (APG) och alkalimetallsalter av naturliga fettsyror.

Detergentkompositioner enligt uppföringen kan innehålla andra detergentkomponenter kända inom området, som t.ex. builders, blekningsmedel, blekaktivatorer, antikorrasionsmedel, sekvestrerande medel, medel som förhindrar återutfällning av smuts, parfymer, enzymstabilisatorer etc.

Detergentkompositionen enligt uppfinningen kan berefas i vilken lämplig form som helst, t.ex. som ett pulver eller en vätska. Enzymet kan stabiliseras i en vätskedergent genom inneslutning av enzymstabilisatorer, såsom 5 har omtalats ovan. Vanligtvis är pH för en lösning av detergentkompositionen enligt uppfinningen mellan 7 och 12 och i vissa fall mellan 7,0 och 10,5. Andra detergentenzymer, såsom proteaser, cellulaser, peroxidaser eller amylaser, kan innefattas i detergentkompositionerna enligt uppfinningen, vilka är antingen åtskilda eller i en kombinerad tillsats som beskrivits ovan.

#### KORT BESKRIVNING AV RITNINGARNA

Föreliggande uppfinning beskrivs i följande text med 15 hänvisning till de bilagda ritningarna, på vilka:

Fig. 1A och B är datormodeller som visar den tredimensionella strukturen för lipidkontaktzonen för *H. lanuginosa*-lipaset när lipaset är i inaktiv (A) respektive i aktiv (B) form. "Vita" rester avser hydrofoba aminosyror 20 (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly och Met), "gula" rester avser hydrofila aminosyror (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr och Cys), "blå" rester avser positivt laddade aminosyror (Lys, Arg och His), och "röda" rester avser negativt laddade aminosyror (Glu och Asp);

Fig. 2A och 2B är datormodeller som visar den tredimensionella strukturen för lipidkontaktzonen av *Rh. miehei*-lipaset när lipaset är i inaktiv (A) respektive i aktiv (B) form. "Vita" rester avser hydrofoba aminosyror (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly och Met), "gula" rester avser hydrofila aminosyror (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr och Cys), "blå" rester avser positivt laddade aminosyror (Lys, Arg och His), och "röda" rester avser negativt laddade aminosyror (Glu och Asp);

Fig. 3 är en schematisk framställning av framställning av plasmider, som kodar för lipasvarianter, genom användning av polymeraskedjereaktion (PCR);

Fig. 4 är en schematisk framställning av tre-stegs-mutagenes genom PCR;

Fig. 5 visar en restriktionskarta över plasmid pA01;

Fig. 6 visar en restriktionskarta över pAHL; och

5 Fig. 7 visar en restriktionskarta över plasmid pARML.

Föreliggande upfinning belyses ytterligare i följande exempel vilka inte är avsedda att på något sätt begränsa skyddsomfånget för upfinningen såsom detta är definierat i patentkraven.

#### ALLMÄNNA METODER

##### Expression av *Humicola lanuginosa*-lipas och *Rhizomucor miehei*-lipas i *Aspergillus oryzae*

15 Kloning av *Humicola lanuginosa*-lipas och *Rhizomucor miehei*-lipas beskrivs i EP 305 216 respektive EP 238 023. Dessa patentpublikationer beskriver också expression och karakterisering av de två lipaserna i *Aspergillus oryzae*. De två använda expressionsplasmiderna benämns p960 (vilken bär *H. lanuginosa*-lipasgenen) och p787 (vilken bär *R. miehei*-lipasgenen).

Expressionsplasmiderna som används i denna ansökan är identiska med p787 och p960 förutom mindre ändringar omedelbart 3' om de lipaskodande regionerna. Modifieringarna gjordes på följande sätt: p960 spjälkades med restriktionsenzymerna NruI och BamHI. Mellan dessa två säten klonades BamHI/NheI-fragmentet från plasmiden pBR322, varvid NheI-fragmentet fylldes i med Klenow-polymeras och plasmiden pA01 (Fig. 5) upprättades, vilken innehåller unika BamHI- och NheI-säten. Mellan dessa unika säten klonades BamHI/XbaI-fragmentet från p960 och p787 för att ge pAHL (Fig. 6) och pARML (Fig. 7).

##### **Sätesriktad *in vitro*-mutagenes i lipasgener:**

35 Tre olika metoder användes för introducering av mutationer i lipasgenerna. En utnyttjad metod var oligonukleotidsätesriktad mutagenes vilken beskrivs av Zoller &

Smith, DNA, vol. 3, nr 6, 479-488 (1984). Metoden beskrivs kortfattat i följande text och beskrivs ingående i exempel 1.

Efter isolering från expressionsplasmiden sätts den  
5 intressanta lipasgenen in i en cirkulär bakteriofag M13-  
vektor. En kemiskt syntetiserad komplementär DNA-sträng  
hybridiseras till det enkelsträngade genomet. Denna DNA-  
sträng innehåller mutationen som skall introduceras, vil-  
ken är flankerad av sekvenser komplementära till lipas-  
10 sekvenser på det cirkulära DNA:t. In vitro förlängs sedan  
ifrågavarande primer biokemiskt längs hela det cirkulära  
genomets längd med hjälp av Klenow-polymeras. Vid trans-  
formation i *E. coli* ger heteroduplexet upphov till dub-  
belsträngat DNA med den önskade sekvensen, från vilken  
15 ett fragment kan isoleras och återinsättas i expres-  
sionsplasmiden.

En annan använd metod beskrivs i Nelsen & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Den involverar  
3-stegsmetoden för generering av ett PCR (polymeras ked-  
20 jereaktion)-fragment, vilket innehåller den önskade muta-  
tionen introducerad genom användning av en kemiskt syntet-  
tiserad DNA-sträng som en av de ifrågavarande primers i  
PCR-reaktionerna. Från det PCR-genererade fragmentet kan  
ett DNA-fragment som bär mutationen isoleras genom klyv-  
25 ning med restriktionsenzymen och därefter återinsättas i  
expressionsplasmiden. Denna metod beskrivs ingående i ex-  
empel 3. I Figur 3 och 4 beskrivs metoden ytterligare.

I ytterligare en metod, som vanligen benämns "kas-  
settmutagenes", ersätts ett segment mellan två restrik-  
30 tionssäten av den lipaskodande regionen med ett synte-  
tiskt DNA-fragment som bär den önskade mutationen.

Exempel 1: Framställning av en plasmid som uttrycker  
D96L-varianten av *Humicola lanuginosa*-lipas

35 **Isolering av lipasgenen**

Expressionsplasmiden p960 innehåller den kodande re-  
gionen för *Humicola lanuginosa*-lipas på ett BamHI/XbaI-

restriktionsfragment (DNA- och aminosyrasekvensen för lisäset visas i bifogad sekvenslista ID nr 1). BamHI/XbaI-fragmentet isolerades enligt följande: Expressionsplasmiden inkuberades med restriktionsendonukleaserna BamHI och 5 XbaI. Förhållandena var följande: 5 µg plasmid, 10 enheter BamHI, 10 enheter XbaI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> och 1 mM DTT i en volym av 50 µl. Temperaturen var 37°C och reaktionstiden 2 timmar. De två 10 fragmenten separerades på en 1% agarosgel och det önskade fragmentet isolerades från gelen.

#### **Ligering till vektorn M13mp18**

Den bakteriofaga vektorn M13mp18 spjälkades med BamHI och XbaI i sin dubbelsträngade, replikativa form under 15 förhållanden som beskrivits ovan. Det isolerade restriktionsfragmentet ligerades till den spjälkade bakteriofag-vektorn i följande reaktionsblandning: 0,2 µg fragment, 0,02 µg vektor, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT och 1 mM ATP i en volym av 20 µl vid 16°C i 3 tim- 20 mar. 5 µl av denna blandning transformeras i E. coli- stammen JM101. Förekomsten av fragment i vektorn identi- fierades genom restriktionsenzymanalys på dubbelsträngat M13-DNA isolerat från transformanterna.

#### **25 Isolering av enkelsträngat (ss) DNA (mall)**

Från transformanten som beskrivits ovan isolerades ss-DNA enligt en metod beskriven av Messing i Gene, 19, 269-276 (1982).

#### **30 5' fosforylering på mutageniseringsprimern**

Mutageniseringsprimern med sekvensen 5'-TTTCTTTCA-ACAAAGAAGTTAAGA-3' fosforylerades vid 5'-änden i en 30 µl reaktionsblandning innehållande 70 mM Tris-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 pmol oligonukleotid 35 och 3,6 enheter T4-polynukleotidkinas. Reaktionen utfördes i 30 minuter vid 37°C. Sedan inaktiverades enzymet genom inkubation av blandningen i 10 minuter vid 65°C.

**Hybridisering av mall och fosforylerad mutagenisering-primer**

Hybridisering av mall och primer utfördes i en volym  
5 av 10  $\mu$ l innehållande 0,5 pmol mall, 5 pmol primer, 20 mM  
Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl och 1 mM DTT  
genom värmning i 65°C i 10 minuter och därefter nedkyl-  
ning till 0°C.

**10 Förlängnings-/ligeringsreaktion**

Till reaktionsblandningen ovan sattes 10  $\mu$ l av föl-  
jande blandning: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP,  
0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  
MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 3 enheter T4-DNA-ligas och 2,5 enheter  
15 Klenow-polymeras. Sedan genomfördes reaktionen i 16 tim-  
mar vid 16°C.

**Transformation av JM101**

Reaktionsblandningen ovan transformeras i olika  
20 utspädningar av CaCl<sub>2</sub>-behandlade E. coli JM101-celler med  
hjälp av standardmetoder och ströks därefter ut på 2 x  
YT-toppagar på 2 x YT-agarplattor. (2 x YT = trypton 16  
g/l, jästextrakt 10 g/l, NaCl 5 g/l. 2 x YT-toppagar = 2  
25 x YT med 0,4% agaros och dessutom autoklaverad. 2 x YT-  
agarplattor = 2 x YT med 2% agar och dessutom autoklave-  
rad). Plattorna inkuberades vid 37°C över natten.

**Identifiering av positiva kloner**

Den använda metoden var plack-hybridisering på mem-  
30 branfilter, vilket beskrivs i följande text: ett nitro-  
cellulosafilter placerades på en platta med en lämplig  
plackdensitet så att filtret blev vått. Filtret badades  
sedan i följande lösningar: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH i 30  
sek., 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 i 1 minut och 2  
35 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M natriumcitrat) fram till senare  
användning. Filtret torkades på 3 mm filterpapper och  
värmdes i 2 timmar vid 80°C i en vakuumugn.

Mutageniseringsprimern med sekvensen 5'-TTCTTTCAACAGAAAGTTAAGA-3' märktes radioaktivt vid 5'-änden i en volym av 30 µl innehållande 70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10 pmol oligonukleotid, 20 pmol  $\gamma$ -32P-ATP och 3,5 enheter T4-polynukleotidkinas. Blandningen inkubades vid 37°C i 30 minuter och sedan i 5 minuter vid 100°C.

Det torkade filtret förhybridiserades i 2 timmar vid 65°C i 6 x SSC, 0,2% bovint serumalbumin, 0,2% Ficoll, 10 0,2% polyvinylpyrrolidon, 0,2% natriumdodecylsulfat (SDS) och 50 µg/ml sonikerat DNA från laxsperma. Sedan sattes reaktionsblandningen som innehöll den märkta sonden till 15 ml nyligen förhybridiserad blandning och filtret badades häri över natten vid 27°C under försiktig omskakning. 15 Efter hybridisering tvättades filtret 3 gånger var 15:e minut i 2 x SSC, 0,1% SDS och därefter autoradiograferades filtret. Efter tvätt i samma lösning, men nu vid 50°C, och ytterligare en autoradiografi, identifierades placker innehållande DNA-sekvenser komplementära till 20 ifrågavarande mutageniseringsprimer.

Eftersom den identifierade klonen är ett resultat från en heteroduplex ströks placket ut igen. Hybridiserings- och identifieringsstegen upprepades.

#### 25 Rening av dubbelsträngat M13-fag DNA

En omselektterad klon användes för infektion av E. colistam JM101. En odling innehållande approximativt 10<sup>8</sup> fager och 5 kolonier JM101 tilläts växa i 5 timmar i 5 ml 2 x YT-medium vid 37°C. Sedan renades dubbelsträngat, 30 cirkulärt DNA från pelletonen enligt en metod beskriven av Birnboim & Doly, Nucleic Acids Res., 1513 (1979).

#### Isolering av ett restriktionsfragment som kodar för modifierat lipas

35 DNA-beredningen (ca 5 µg) som isolerades ovan spjälkades med 10 enheter av vart och ett av restriktionsendonukleaserna BamHI och XbaI i 60 µl av 100 mM NaCl, 50 mM

Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> och 10 mM DTT i 2 timmar vid 37°C. DNA-produkterna separerades på en agarosgel och fragmentet renades från gelen.

5 **Ligering till Aspergillus expressionsvektorn pA01 (Figur 5)**

Det isolerade restriktionsfragmentet ligerades till Aspergillus-vektorn pA01 spjälkad med restriktionsenzymerna BamHI och NheI i följande reaktionsblandning: 0,2 µg fragment, 0,02 µg vektor, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP i en total volym av 20 µl. 10 5 µl av denna reaktionsblandning användes för transformasjon av *E. coli* MC1061, i vilken den modifierade expressionsplasmiden identifierades och propagerades. Plasmiden benämndes pAHLD96L och är identisk med pAHL förutom 15 det modifierade kodonet.

**Sekvensverifiering av pAHLD96L**

Den mutageniserade plasmiden sekvenserades direkt på 20 den dubbelsträngade plasmiden med hjälp av dideoxikedjetermineringsmetoden som ursprungligen beskrevs av Sanger.

Exempel 2: Framställning av plasmider som uttrycker andra *Humicola*-lipasvarianter

25 Andra mutanta lipasgener framställdes med hjälp av samma metod som beskrevs i Exempel 1. Plasmidnamn och primers som används i modifieringarna anges nedan.

|    | <u>Plasmidnamn</u> | <u>Primersekvens</u>                 |
|----|--------------------|--------------------------------------|
|    | pAHLD96N           | 5'-TCTTTCAAGTTGAAGTTAAGA-3'          |
|    | pAHLD111N          | 5'-GTGAAGCCGTTATGTCCCCCTG-3'         |
|    | pAHLE87Q           | 5'-CGATCCAGTTTGTATGGAACGA-3'         |
| 5  | pAHLR209A/E210A    | 5'-GCTGTAACCGAAAGCAGCCGGCGGGAGTCT-3' |
|    | pAHLE87A           | 5'-CGATCCAGTTAGCTATGGAACG-3'         |
|    | pAHLE56A           | 5'-CTCCAGAGTCAGCAAACGAGTA-3'         |
|    | pAHLE56Q           | 5'-CCAGAGTCTTGAACGAGTAG-3'           |
|    | pAHLD111L          | 5'-AAGTGAAGCCCAAATGTCCCCCTG-3'       |
| 10 | pAHLE210A          | 5'-TGTAAACGAAAGCGCGGGCGG-3'          |
|    | pAHLE210Q          | 5'-TAACCGAATTGGCGCGGGGG-3'           |
|    | pAHLR209A          | 5'-AACCGAATTTCAGCCGGCGGGAGT-3'       |

Exempel 3: Framställning av en plasmid som uttrycker15 D254N-varianten av *Humicola lanuginosa*-lipasLinjärisering av plasmid pAHL

Den cirkulära plasmiden pAHL linjäriseras med restriktionsenzymet SphI i en volym av 50 µl av följande reaktionsblandning: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 20 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditiotreitol, 1 µg plasmid och 2 enheter SphI. Spjälkningen utfördes i 2 timmar vid 37°C. Reaktionsblandningen extraherades med fenol (bringad i jämvikt med Tris-HCl, pH 7,5) och fälldes ut genom tillsats av 2 volymer iskall 96% etanol. Efter centrifugering och 25 torkning av pelleten upplöstes i 50 µl H<sub>2</sub>O och koncentrationen uppskattades på en agarosgel.

PCR-mutagenes i 3 steg

30 3-stegs mutagenesering involverar användning av fyra primers, vilket visas i Figur 4:

Mutageniseringsprimer (=A): 5'GTGCGCAGGGATGTTCGGAAT-GTTAGG-3'

35 PCR-hjälpare 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTAC-CTATTAAATCGGC-3'

PCR-hjälpare 2 (=C): 5'-CCATGGCTTCACGGTGTCT-3'

PCR-handtag (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Alla 3 stegen utfördes i följande buffert innehållande: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% gelatin, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 5 0,2 mM TTP, 2,5 enheter Taq-polymeras.

I steg 1 sattes 100 pmol primer A, 100 pmol primer B och 1 fmol linjäriserad plasmid till en total volym på 100 µl reaktionsblandning och 15 cykler, varvid varje cykel bestod av 2 minuter vid 95°C, 2 minuter vid 37°C och 10 minuter vid 72°C, genomfördes.

Koncentrationen av PCR-produkten uppskattades på en agarosgel. Sedan genomfördes steg 2. 0,6 pmol steg 1-produkt och en 1 fmol linjäriserad plasmid innehållades i en total volym 100 µl av tidigare nämnda buffert och 1 cykel, vilken bestod av 5 minuter vid 95°C, 2 minuter vid 37°C och 10 minuter vid 72°C, genomfördes.

Till steg 2-reaktionsblandningen sattes 100 pmol primer C och 100 pmol primer D (1 µl av varje) och 20 cykler, varvid varje cykel bestod av 2 minuter vid 95°C, 20 2 minuter vid 37°C och 3 minuter vid 72°C, genomfördes. Denna behandling omfattade steg 3 i mutageniseringsproceduren.

#### **Iisolering av muterat restriktionsfragment**

25 Produkten från steg 3 isolerades från en agarosgel och återupplöstes i 20 µl H<sub>2</sub>O. Sedan spjälkades den med restriktionsenzymet BspMII i en total volym av 50 µl med följande sammansättning: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT och 10 enheter BspMII. Inkubation utfördes vid 37°C i 2 timmar. Ifrågavarande 264 bp BspMIII-fragment isolerades från en agarosgel.

#### **Ligering till expressionsvektor pAHL**

35 Expressionsplasmiden pAHL klyvdes med BspMII under förhållanden som beskrivits ovan och det stora fragmentet isolerades från en agarosgel. Till denna vektor ligerades det muterade fragmentet isolerat ovan och ligeringsbland-

ningen användes för transformation av *E. coli*. Förekomsten och orienteringen av fragmentet verifierades genom klyvning av en plasmidberedning från en transformant med restriktionsenzymer. Sekvensanalys genomfördes på den 5 dubbelsträngade plasmiden med hjälp av dideoxikedjetermeringsmetoden som utvecklats av Sanger. Plasmiden benämndes pAHLD254N och är identisk med pAHL, förutom det ändrade kodonet.

10 Exempel 4: Framställning av plasmider som uttrycker andra *Humicola lipas*-varianter

Följande mutanter framställdes med hjälp av samma metod som beskrevs i Exempel 3, förutom att andra restriktionsenzymer användes för spjälkning av PCR-produkten och annan vektor för omkloning av det muterade fragmentet användes. Plasmidnamn och primers som användes för modifieringarna anges nedan.

|    | <u>Plasmidnamn</u> | <u>Primer A-sekvens</u>   |
|----|--------------------|---|
| 20 | pAHLD254K          | 5'-GTGCGCAGGGATCTCGGAATGTT-3'   |
|    | pAHLD254R          | 5'-GTGCGCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'  |
|    | pAHLD242N          | 5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'   |
|    | pAHLD242N/D254N    | 5'GTGCGCAGGGATGTTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGCCG-<br>CCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3' |
| 25 | pAHLE87R           | 5'-CCCGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCGG-3'                                     |
|    | pAHLE87K           | 5'-CGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'                                     |

Exempel 5: Framställning av lipasvarianter genom kombination av tillgängliga mutanter

Följande mutanter framställdes genom kombination av 30 plasmidfragment från mutanter som framställdes ovan. Exempelvis framställdes pAHLE87K/D254K genom isolering av ifrågavarande BamHI/BstXI-restriktionsfragment från pAHLE87K och därefter insättning av fragmentet i pAHLD254K spjälkad med BamHI och BstXI:

Plasmid  
pAHLE87K/D254K

pAHLE87Q/D254N/D242/E210Q  
 pAHLE87Q/D242N/E210Q  
 pAHLR209A/E210A/D96L  
 pAHLR209A/E210Q/E56Q  
 5 pAHLE210Q/D242N/D254N  
 pAHLE87Q/E210Q/D242N

Exempel 6

Transformation av Aspargillus oryzae (allmän metod)

10 100 ml YPD (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) inkokulerades med sporer från *A. oryzae* och inkuberades under omskakning i ca 24 timmar. Ifrågavarande mycel skördades genom filtrering genom en miraduk och tvättades med 200 ml 0,6 M MgSO<sub>4</sub>. Ifrågavarande mycel suspenderades i 15 ml 1,2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 5,8. Suspensionen kyldes på is och 1 ml buffert innehållande 120 mg Novozym® 234, sats 1687, tillsattes. Efter 5 minuter tillsattes 1 ml 12 mg/ml BSA (sigma typ H25) och inkubation under försiktig  
 15 omrörning fortsatte i 1,5 - 2,5 timmar vid 37°C tills att ett stort antal protoplaster var synliga i ett prov inspekterat under mikroskop.

Suspensionen filtrerades genom miraduken, varefter filtratet fördes över till ett sterilt rör och täcktes med 5 ml 0,6 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0. Centrifugering utfördes i 15 minuter vid 1000 g och protoplasterna uppsamlades från den övre delen av MgSO<sub>4</sub>-bädden. 2 volymer STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) sattes till protoplastsuspensionen och  
 20 blandningen centrifugeras i 5 minuter vid 1000 g. Protoplastpelleten resuspenderades i 3 ml STC och ompelleteras. Detta upprepades. Slutligen resuspenderades protoplasterna i 0,2 - 1 ml STC.

25 100 µl protoplastsuspension blandades med 5- 25 µg p3SR2 (en *A. nidulans* amdS-gen bärande den plasmid som beskrivs i Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., vol. 3, nr 8, 1430-1439, augusti 1983) i 10 µl STC. Blandningen läm-

nades vid rumstemperatur i 25 min. 0,2 ml 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl<sub>2</sub> och 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5 tillsattes och försiktigt om blandning genomfördes (två gånger) och slutligen tillsattes 0,85 ml av samma lösning 5 och försiktig om blandning genomfördes. Blandningen lämnades i rumstemperatur i 25 minuter, centrifugeras vid 2 500 g i 15 minuter och pelleten resuspenderades i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter ytterligare en sedimentering spreds protoplasterna ut på minimala plattor (Cove, Biochem. 10 Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) innehållande 1,0 M sackaros, pH = 7,0, 10 mM acetamid som kvävekälla och 20 mM CsCl för inhibering av bakgrundstillväxt. Efter inkubation i 4 - 7 dagar vid 37°C plockades sporer, vilka sus- 15 penderades i sterilt vatten och spreds ut för erhållande av enstaka kolonier. Denna procedur upprepades och sporer från en enstaka koloni efter den andra om isoleringen be- varades som en definierad transformant.

Exempel 7

20 Expression av lipasvarianten D96L i A. oryzae

pAHLD96L transformeras i A. oryzae IFO 4177 genom samtransformation med p3SR2 innehållande amdS-genen från A. nidulans som beskrivs i Exempel 15. Protoplaster framställda som beskrivits inkuberas med en blandning av 25 lika mängder pAHLD96L och p3SR2, varvid approximativt 5 µg av var och en användes. 9 transformanter som kunde använda acetamid som enda kvävekälla om isoleras två gånger. Efter tillväxt på YPD i tre dagar analyseras od- 30 lings supernatanter med hjälp av analysen för lipasaktivitet som beskrivs i exempel 16 (Rening av lipasvarianter enligt uppfinningen). Den bästa transformanten selekteras för ytterligare studier och tilläts växa i en 1-li- 35 ters skakflaska med 200 ml FG4-medium (3% sojamjöl, 3% maltodextrin, 1% pepton, vilket justeras till pH 7,0 med 4 M NaOH) i 4 dagar vid 30°C. Under dessa förhållanden åstadkom transformanten ca 500 lipasenheter per ml od- ling.

De andra lipasvarianterna framställdes väsentligen såsom beskrivits ovan, varvid den allmänna metoden som beskrivits i Exempel 6 användes.

5 Exempel 8

Rening av lipasvarianter enligt uppfinningen

Analys av lipasaktivitet:

Ett substrat för lipas framställdes genom emulgering av glyceroltributyrat (MERCK) med hjälp av arabiskt gummi som emulgator. Lipasaktivitet analyserades vid pH 7 med hjälp av en statisk pH-metod. En enhet lipasaktivitet (LU/mg) definierades som den mängd som krävdes för att frigöra en mikromol fettsyra per minut.

10 Steg 1: Centrifugera fermenteringssupernatanten, kasta fällningen. Justera pH för supernatanten till 7 och tillsätt successivt en lika stor volym kall 96% etanol. Tillåt blandningen stå i 30 minuter i ett isbad. Centrifugera och kasta fällningen.

15 Steg 2: Jonbyteskromatografi. Filtrera supernatanten och applicera på DEAE-fast flow (Pharmacia TM)-kolonn, vilken bringats i jämvikt med 50 mM tris-acetatbuffert pH 7. Tvätta kolonnen med samma buffert tills att absorption vid 280 nm är mindre än 0,05 OD. Eluera den bundna enzymatiska aktiviteten med en linjär saltgradient i samma buffert (0 till 0,5 M NaCl) med fem kolonnvolymer. Slå samman de fraktioner som innehåller enzymatisk aktivitet.

20 Steg 3: Hydrofobisk kromatografi. Justera molariteten i sammanslagningen som innehåller enzymatisk aktivitet till 0,8 M genom tillsats av fast ammoniumacetat. Applicera enzymet på en TSK-gel Butyl-toyopearl 650 C kolonn (från Tosoh Corporation, Japan), vilken bringats i jämvikt i förväg med 0,8 M ammoniumacetat. Tvätta det obundna materialet med 0,8 M ammoniumacetat och eluera det bundna materialet med destillerat vatten.

25 Steg 4: Sammanslagning innehållande lipasaktivitet späds med vatten för justering av konduktans till 2 mS

och pH till 7,0. Applicera sammanslagningen på en High performance Q Sepharose (Pharmacia)-kolonn, vilken bringats i jämvikt i förväg med 50 mM trisacetatbuffert pH 7. Eluera det bundna enzymet med en linjär saltgradient.

5

Exempel 9

**Tvättningseffekten för lipasvarianter enligt uppföringen**

Tvättningseffekten för lipasvarianter från *Humicola Lanuginosa* enligt uppföringen utvärderades i jämförelse med vildtypslipaset från *H. lanuginosa* med avseende på enzymdosen i mg protein per liter enligt OD<sub>280</sub>.

Tvättförsök genomfördes i 150 ml bågare placerade i ett termostaterat vattenbad. I bågarna genomfördes omrörning med triangulära magnetiska stavar.

15 De experimentella förhållanden var följande:

Metod: 3 cykler med torkning över natten mellan varje cykel

Tvättväska: 100 ml per bågare

Provbitar: 6 provbitar (3,5 x 3,5 cm) per bågare

20 Textil: 100% bomull, Test Fabrics style #400

Färgämne: Isterflott färgat med sudanrött (0,75 mg färgämne/g isterflott). 6 µl isterflott uppvärmt till 70°C applicerades på mitten av varje provbit. Efter applicering av färgämnet värmdes provbitarna i en ugn vid 75°C i 30 minuter. Provbitarna bevarades sedan över natten vid rumstemperatur före den första tvätten.

Detergent: LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.) 1,17 g/l

30 AEO (Dobanol 25-7) 0,15 g/l

Natriumtrifosfat 1,25 g/l

Natriumsulfat 1,00 g/l

Natriumkarbonat 0,45 g/l

Natriumsilikat 0,15 g/l

35 pH: 10,2

Lipaskonc.: 0,075, 0,188, 0,375, 0,75 och 2,5 mg lipas protein per liter

Tid: 20 minuter  
 Temperatur: 30°C  
 Sköljning: 15 minuter i rinnande kranvatten  
 Torkning: Över natten vid rumstemperatur (~20°C,  
 5 30-50% relativ fuktighet)  
 Utvärdering: Efter tredje tvätten mättes reflektansen  
 vid 460 nm.

**Resultat**

10 Dos-responskurvor jämfördes för lipasvarianterna och  
 det naturliga lipaset från *H. lanuginosa*. Dos-responskur-  
 vor beräknades genom insättning av uppmätta data i föl-  
 jande ekvation:

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

15 där  $\Delta R$  är effekten uttryckt i reflektansenheter  $C$  är  
 enzymkoncentrationen (mg/l)  
 $\Delta R_{\max}$  är en konstant som uttrycker den maximala ef-  
 fekten  
 20  $K$  är en konstant;  $K^2$  uttrycker enzymkoncentratio-  
 nen där halva den maximala effekten har uppnåtts.

Med avseende på de karakteristiska konstanterna  $\Delta R_{\max}$   
 och  $K$  som finns för såväl varje lipasvariant som för  
 25 vildtypslipaset beräknades förbättringsfaktorer. Förbätt-  
 ringsfaktorn definieras som

$$f_{\text{improve}} = C_{\text{WT}}/C \quad (II)$$

30 och uttrycker den mängd lipasvariantprotein som krävs för  
 erhållande av samma effekt som den som erhölls med 0,25  
 mg/l vildtypsproteinreferens ( $C_{\text{WT}}$ ).

Proceduren för beräkning av förbättringsfaktorn var  
 således följande:

35 1) Effekten för vildtypsproteinet vid 0,25 mg/l  
 $(\Delta R_{\text{wildtyp}})$  beräknades med hjälp av ekvation (I);

2) Lipasvariantkoncentration som resulterar i samma effekt som vildtypen vid 0,25 mg/l beräknades med hjälp av följande ekvation:

$$5 \quad C = (K_{\text{variant}}) \frac{\Delta R_{\text{(vildtyp)}}}{\Delta R_{\text{max(variant)}} - \Delta R_{\text{(vildtyp)}}})^2 \quad (\text{III})$$

3) Förbättringsfaktorn beräknades med hjälp av ekvation (II).

Resultaten visas i Tabell 1 nedan.

10

TABELL 1

|    | Variant               | Förbättringsfaktor |
|----|-----------------------|--------------------|
| 15 | D96L                  | 4,4                |
|    | D111L                 | 1,0                |
|    | E87A                  | 1,0                |
|    | E56A                  | 1,6                |
|    | E56Q                  | 2,6                |
|    | R209A                 | 1,1                |
| 20 | D242N                 | 1,7                |
|    | R209A+E210A           | 1,9                |
|    | R209A+E210A+D96L      | 2,8                |
|    | E210Q+D242N+D254N     | 1,8                |
| 25 | R209A+E210A+D96L+E56Q | 1,5                |

Från Tabell 1 kan man se att lipasvarianterna R209A+E210A, E56Q och D96L har ett avsevärt förbättrad tvätteffekt jämfört med vildtypslipaset. Detta kan möjliggöras tillskrivas den minskade negativa laddningen och den ökade hydrofobiciteten hos dessa varianter, vilket resulterar i ökad adsorption under tvättning och således högre aktivitet under torkningsfasen. Effekten för lipasvarianterna E87A, D111L och R209A stämmer överens med den för vildtypsenzymet.

Exempel 10**Förbättrad termostabilitet för lipasvarianter**

Termostabiliteten för selekterade varianter från *H lanuginosa*-lipas har studerats genom differentiell skanningkalorimetri (DSC). Med hjälp av denna metod bestäms den termiska denatureringstemperaturen, **T<sub>d</sub>**, genom värm-

5 ningkalorimetri (DSC). Med hjälp av denna metod bestäms den termiska denatureringstemperaturen, **T<sub>d</sub>**, genom värm-

ning av en enzymlösning vid en konstant programmerad hastighet.

**10 Experiment**

En differentiell skanningkalorimeter, MC-2D, från MicroCal Inc. användes för undersökningarna. 50 mM bufferlösningar framställdes vid följande pH-värden: 4 (acetat), 7 (TRIS-acetat), 10 (glycin). Enzymkoncentrationen låg mellan 0,6 och 0,9 mg/ml och en total volym på ca 1,2 ml användes för varje experiment. Alla prover värmdes från 5°C till 95° vid en svephastighet på 90°C/timma.

**20 Resultat**

Resultaten för vildtypen och de valda mutanterna visas i tabellen nedan.

| Nr | Mutation     | pH 4           |                 | pH 7           |                 | pH 10          |                 |
|----|--------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
|    |              | T <sub>d</sub> | dT <sub>d</sub> | T <sub>d</sub> | dT <sub>d</sub> | T <sub>d</sub> | dT <sub>d</sub> |
| WT | -            | 58,9           | -               | 74,7           | -               | 69,3           | -               |
| 1  | <b>F211A</b> | 60,2           | +1,3            | 75,8           | +1,1            | 70,3           | +1,0            |
| 2  | <b>T267R</b> | 59,4           | +0,5            | 75,7           | +1,0            | 70,0           | +0,7            |
| 3  | <b>D111N</b> | 58,3           | -0,6            | 75,6           | +0,9            | 69,9           | +0,6            |
| 4  | <b>F211L</b> | 57,8           | -1,1            | 74,8           | 0,1             | 69,4           | 0,1             |

25 **Notera:** dT<sub>d</sub> betecknar förändringen i termostabilitet, vilket är ett resultat av mutationen.

Exempel 11**Lagringsstabilitet för lipasvarianter från *H. lanuginosa*  
i vätskedetergent**

Flera varianter testades i en provvätskedetergent  
5 med följande sammansättning:

|    |               | % vikt/vikt    |
|----|---------------|----------------|
|    | Anjonisk      | LAS            |
|    |               | AS             |
| 10 |               | Tvål           |
|    | Icke-jonisk   | AEO            |
|    | Lösningsmedel | 1,2-propandiol |
|    |               | Etanol         |
|    | Buffert       | TEA            |
| 15 | Builder       | Natriumcitrat  |

|    |                    |                                 |
|----|--------------------|---------------------------------|
|    | Neutraliserings-   |                                 |
|    | medel              | NaOH                            |
|    | Stabilisatorer etc | SXS                             |
| 20 |                    | Ca <sup>2+</sup>                |
|    |                    | Fosfonat                        |
|    |                    | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|    | Vatten             | Sätt till 100%                  |
|    | pH                 | 8 eller 10                      |
| 25 |                    |                                 |

1000 LU per gram detergent tillsattes och i vissa prover tillsattes 0,025 AU/g (Alcalase®). Proverna lagrades enligt följande schema (tre prover av varje):

|    |                      |             |             |
|----|----------------------|-------------|-------------|
| 30 | Lagringstemperatur:  | <u>-18°</u> | <u>30°C</u> |
|    | Detergent            |             |             |
|    | pH 8, inget proteas  | 2 & 7 dagar | 2 & 7 dagar |
|    | pH 8, 0,025 AU/g     | 2 dagar     |             |
|    | pH 10, inget proteas | 7 dagar     | 7 dagar     |

35 Efter denna inkubation analyserades proverna enligt LU-metoden (Novo Nordisk AF 95,5).

Under antagande av att lipasaktivitetssönderfall följer en första ordningens kinetik, kan sönderfallshastigheten bestämmas till:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

5 varvid  $A(t)$  är enzymaktiviteten vid tid  $t$ ,  $A_0$  är den initiale aktiviteten och  $k$  är första ordningens hastighetskonstant.

För detergентen som innehåller proteas kan en hastighetskonstant för proteolysen beräknas från

$$10 A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k+k_p] \cdot t)$$

där  $k_p$  är hastighetskonstanten för proteolys och där  $k$  beräknas från stabilitetsdata bestämda i detergентen utan proteas.

I varje experiment inkluderades vildtypslipaset från 15 *H. lanuginosa* som en referens och jämförelse mellan varianterna och vildtypen görs endast inom ett experiment för att man ska kunna reducera variationsosäkerheten mellan experimenten. Resultaten anges nedan och den relativa förbättringen hos en variant i förhållande till vildtypen 20 anges som:

$$IF_x = k_{wt}/k_x$$

där IF står för förbättringsfaktor,  $k_{wt}$  är sönderfallshastighetskonstanten för vildtypen (vid givna förhållanden) och  $k_x$  är motsvarande hastighetskonstant för varianten

25 ifråga i samma experiment. IF uttrycker den relativa förbättringen som halveringstid ( $IF_x = 2$  indikerar att halveringstiden för variant  $x$  är två gånger så lång som den för vildtypen i samma experiment). Baserat på en uppskattning av replikatvariationer inom ett experiment betraktas  $IF < 0,7$  eller  $IF > 1,3$  som signifikant. Enheten för  $k$  är  $(\text{dag})^{-1}$ .

|   | Variant       | Experi-<br>ment | pH 8                       |                                       | pH 10                  |  |
|---|---------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|--|
|   |               |                 | inget<br>prot.<br>k*) IF*) | pH 8<br>+Alkalas<br>k <sub>p</sub> IF | Inget<br>prot.<br>k IF |  |
| 5   | Vildtyp       | 3               | 0,02                       | 0,48                                  | 0,19                   |  |
|   |               | 5               | 0,02                       | 0,40                                  | 0,16                   |  |
|   |               | 6               | 0,00                       | 0,34                                  | 0,09                   |  |
|   |               | 7               | 0,01                       | 0,52                                  | 0,22                   |  |
| 10  | 8 a           | 0,01            | 0,50                       | 0,09                                  |                        |  |
|   |               | b               | 0,01                       | 0,52                                  | 0,07                   |  |
| 15  | D96N          | 3               | 0,00                       | 0,21 2,3                              | 0,15 1,3               |  |
|   |               | 5               | 0,02                       | 0,26 1,6                              | n.d.                   |  |
| 20  | D111N         | 3               | 0,00                       | 0,50 1,0                              | 0,16 1,2               |  |
|   |               | 5               | 0,02                       | 0,31 1,3                              | 0,13 1,2               |  |
| 25  | E56Q          | 3               | 0,01                       | 0,22 2,2                              | 0,14 1,4               |  |
|   | D96L          | 6               | 0,01                       | 0,17 2,0                              | 0,08 1,2               |  |
|   |               | 7               | 0,00                       | 0,23 2,3                              | 0,09 2,6               |  |
| 30  | R209A/E210A/- |                 |                            |                                       |                        |  |
|   | D96L          | 7               | 0,02                       | 0,36 1,4                              | 0,10 2,3               |  |
|   | E210Q/D242N/- |                 |                            |                                       |                        |  |
| 35  | D254N         | 7               | 0,02                       | 0,49 1,0                              | n.d.                   |  |
|   |               |                 |                            |                                       |                        |  |
| *) är i detergентen vid pH 8 i alla fall mycket låg, och beroende på den mycket korta lagringstiden (7 dagar, approximativt 90% restaktivitet) bestäms inte värdet speciellt precist. Följaktligen bestäms inte IF. |               |                 |                            |                                       |                        |  |

Sammanfattningsvis hade ett antal av de testade varianterna förbättrad resistens mot proteolytisk nedbrytning och nästan alla hade förbättrad resistens mot alkalisca förhållanden.

#### Exempel 12

#### **Specifik aktivitet**

Högre specifik aktivitet (antalet substratmolekyler klyvda per enhetstid per enhetsmängd) uppmättes för lipasvarianterna, vilket visas nedan, i jämförelse med vildtypen (wt). Detta betyder att dessa lipaser uppvisar bättre funktion vad beträffar hydrolys av det verkliga substratet.

Lipaserna fermenterades och renades på samma sätt. De renade lipaserna testades i en standard LU-analys (analytisk metod, internt nr från NOVO NORDISK AF 95/6-GB 1991.02.07). Provet analyserades två gånger och medelvärdena redovisas i tabellform. Mängden protein uppskattades genom optiska densitetsmätningar på en Shimadzu-spektrofotometer vid våglängden 280 nm. Provet betraktades som rent när det proportionella värdet för OD280 delat med OD260 var större än 1,6, i kombination med användning av enkelbands SDS-polyakrylamidgelektrofores.

| <i>Humicola lanuginosa</i> | Specifik aktivitet LU/OD280 |
|----------------------------|-----------------------------|
| D111N                      | 4290*                       |
| E56A                       | 4890*                       |
| L206V                      | 4750                        |
| R209*/E210*                | 6686                        |
| R209A/E210A/D96L           | 4818                        |
| wt                         | 3790                        |

\* Testades endast en gång

## SEKVENSLISTA

## (1) ALLMÄN INFORMATION:

- (i) SÖKANDE: Novo Nordisk A/S
- (ii) UPPFININGENS TITEL: Lipasvarianter
- (iii) ANTAL SEKVENSER: 2
- (iv) KORRESPONDENSADRESS:
  - (A) ADDRESSAT: Novo Nordisk A/S
  - (B) GATA: Novo Allé
  - (C) STAD: Bagsvaerd
  - (E) LAND: Denmark
  - (F) POSTNUMMER: 2880
- (v) AV DATOR LÄSBAR FORM:
  - (A) TYP AV MEDIUM: Floppy disk
  - (B) DATOR: IBM PC compatible
  - (C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) MJUKVARA: PatentIn Release #1,0, Version #1,2
- (vi) FÖR NÄRVARANDE ANSÖKNINGSINFORMATION:
  - (A) ANSÖKNINGSNUMMER:
  - (B) INLÄMNINGSDATUM:
  - (C) KLASIFICERING :
- (vii) TIDIGARE ANSÖKNINGSINFORMATION:
  - (A) ANSÖKNINGSNUMMER: DK 2196/90
  - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-SEP-1990
- (viii) TIDIGARE ANSÖKNINGSINFORMATION:
  - (A) INLÄMNINGSDATUM: DK 2194/90
  - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-SEP-1990
- (vii) TIDIGARE ANSÖKNINGSNUMMER:
  - (A) ANSÖKNINGSNUMMER: DK 2195/90
  - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-sep-1990
- (viii) OMBUDSINFORMATION:
  - (A) NAMN: Thalsoe-Madsen, Birgit
  - (C) REFERENS/DOCKET: 3520.204-W0
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
  - (A) TELEFON: +45 4444 8888
  - (B) TELEFAX: +45 4449 3256
  - (c) TELEFON: 37304

## (2) INFORMATION FÖR SEK ID NR:1

- (i) SEKVENSRAKTÄRISTIKA:
  - (A) LÄNGD: 918 baspar
  - (B) TYP: Nukleinsyra
  - (C) STRÄNGTYP: Enkel
  - (D) TOPOLOGI: Linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: cDNA
- (vi) URSPRUNGLIG KÄLLA:
  - (A) ORGANISM: Humicola lanuginosa
- (ix) SÄRDRAG:
  - (A) NAMN/NYCKEL: CDS
  - (B) LÄGE: 1..873
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEQ ID NR:1:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG 48  
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 1 5 10 15

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC 96  
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 20 25 30

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT 144  
 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 35 40 45

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC 192  
 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 50 55 60

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT 240  
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 65 70 75 80

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA 288  
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 85 90 95

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC 336  
 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile

| 100   | 105 | 110 |     |
|---|-----|-----|-----|
| GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC | 384 |     |     |
| Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT | 432 |     |     |
| Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT | 480 |     |     |
| Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GCA TTG GCA ACT GTT     | 528 |     |     |
| Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA | 576 |     |     |
| Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC | 624 |     |     |
| Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT | 672 |     |     |
| Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA | 720 |     |     |
| Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT | 768 |     |     |
| Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT | 816 |     |     |
| Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG | 864 |     |     |
| Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT   | 918 |     |     |
| Thr Cys Leu   |     |     |     |

## (2) INFORMATION FÖR SEK ID NR:2

(i) SEKVENSKARAKTÄRISTIKA:  
 (A) LÄNGD: 291 aminosyror  
 (B) TYP: Aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: Linjär

(ii) MOLEKYLTYP: Protein

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEQ ID NR: 2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile  
 100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser

0548228

39

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 180   | 185 | 190 |
| Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro |     |     |
| 225   | 230 | 240 |
| Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Thr Cys Leu   |     |     |
| 290   |     |     |

NZAS-0027069

PATENTKRAV

1. Enzymatiskt aktiv lipasvariant av ett moderlipas, vilket moderlipas innehåller en trypsinliknande katalytisk triad innehållande en aktiv serin lokaliseras i en väsentligen hydrofobisk, långsträckt bindningsficka av lipasmolekylen och innehåller en på ytan ej basparad region som täcker den aktiva serinen när lipaset föreligger i inaktiv form, varvid den på ytan ej basparade regionen ändras för exponering av resterna i det aktiva sätet när lipaset aktiveras, varigenom en lipidkontaktzon bildas vilken är lokaliseras inom den del av lipasstrukturen som innehåller den aktiva serinresten, och vilken består av en yta med ökad ythydrofobicitet som interagerar med lipidsubstratet vid eller under hydrolysis, vari den elektrostatiska laddningen och/eller hydrofobiciteten för lipidkontaktzonerna har ändrats genom deletion eller substitution av en eller flera negativt laddade aminosyrarester i lipidkontaktzonerna med neutral(a) eller positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom substitution av en eller flera neutrala aminosyrarester med positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom deletion eller substitution av en eller flera hydrofila aminosyrarester med hydrofob(a) aminosyrarest(er), med det förbehållet att nämnda lipasvariant skiljer sig från varianter av ett sådant moderlipas som är isolerbart från *Pseudomonas putida* ATCC 53552, i vilken Gln vid position 127 har ersatt Arg och/eller Phe-resten vid position 207 har ersatt Thr, Gly, Lys eller Ala.
2. Lipasvariant enligt krav 1, vari en eller flera glutaminsyra- eller asparginsyraester i nämnda lipidkontaktzon är substituerade med glutamin, asparagine, alanin, leucin, valin, serin, treonin, lysin eller arginin.
3. Lipasvariant enligt krav 1 eller 2, vari moderlipaset är ett mikrobiellt lipas.

4. Lipasvariant enligt krav 3, vari moderlipaset är ett fungalt lipas, företrädesvis erhållt från en stam av *Humicola* eller *Rhizomucor*.

5. Lipasvariant enligt krav 4, vari moderlipaset är ett *Rhizomucor miehei*-lipas.

6. Lipasvariant enligt krav 5, vari en eller flera aminosyrarester är substituerade enligt följande:

D91N,K,R,A,V,L,S,T;

10 D256N,K,R,A,V,L,S,T;

D226N,K,R,A,V,L,S,T;

D61N,K,R,A,V,L,S,T;

D113N,K,R,A,V,L,S,T;

E201Q,K,R,A,V,L,S,T; or

15 D243N,K,R,A,V,L,S,T.

7. Lipasvariant enligt krav 4, vari moderlipaset är ett *Humicola lanuginosalipas*.

20 8. Lipasvariant enligt krav 7, vari en eller fler aminosyrarester är substituerade enligt följande:

E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V;

D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V;

D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V;

25 E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V;

E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V;

D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V;

D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V;

30 D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V

E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

35 D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

T267K,R;  
S85K,R;  
5 T226K,R;  
N88K,R;  
N92K,R;  
I255K,R;  
10 I202K,R;  
L206K,R;  
.R209A  
L259K,R;  
V203K,R; or  
15 L227K,R;

särskilt en lipasvariant innehållande följande  
substitutioner:

20 E87Q + D254N + D242N + E210Q;  
E87Q + D254N + E210Q;  
D96N + E87Q + D254N;  
R209A + E210A;  
R209A+R210A+D96L; or  
25 E210Q+D242N+D254N

9. Lipasvariant enligt krav 3, vari moderlipaset  
är ett jästlipas, t.ex. erhållit från en stam av *Candida*,  
30 eller ett bakteriellt lipas, t.ex. erhållit från en stam  
av *Pseudomonas*.

10. DNA-konstruktion innehållande en DNA-sekvens  
som kodar för en lipasvariant enligt något av kraven 1-9.

11. Rekombinant expressionsvektor, vilken bär en  
35 DNA-konstruktion enligt krav 10.

12. Cell som är transformerad med en DNA-konstruk-  
tion enligt krav 10 eller en vektor enligt krav 11.

13. Cell enligt krav 12, vilken är en fungal cell, t.ex. hörande till släktet *Aspergillus*, såsom *A. niger*. *A. oryzae* eller *A. nidulans*; en jästcell, t.ex. hörande till en stam av *Saccharomyces*, såsom *S. cerevisiae*, eller 5 en metylotrofisk jäst från släktet *Hansenula*, såsom *H. polymorpha*, eller *Phichia*, såsom *P. pastoris*; eller en bakteriell cell, t.ex. hörande till en stam av *Bacillus*, såsom *B. subtilis* eller *B. lentus*.

14. Cell enligt krav 12, vilken är en växtcell, 10 t.ex. hörande till *Solanaceae*, såsom *Solanum tuberosum*, eller *Nicotiana tabacum*.

15. Förfarande för framställning av en lipasvariant enligt något av kraven 1-9, vari en cell enligt något av kraven 12-14 odlas eller tillåts växa under förhållanden 15 som gynnar framställningen av lipasvarianten och lipasvarianten därefter utvinns från odlingen eller växten.

16. Detergenttillsats innehållande en lipasvariant enligt något av kraven 1-9, eventuellt i form av ett granulat som inte dammar, en stabiliserad vätska eller ett 20 skyddat enzym.

17. Detergenttillsats enligt krav 16, vilken innehåller 0,02-200 mg enzymprotein/g tillsats.

18. Detergenttillsats enligt krav 16 eller 17, vilken dessutom innehållar ytterligare enzym, såsom ett proteas, amylas, peroxidas och/eller cellulas. 25

19. Detergentkomposition innehållande en lipasvariant enligt något av kraven 1-9.

20. Detergentkomposition enligt krav 19, vilken dessutom innehållar ytterligare enzym, såsom ett proteas, amylas, peroxidas och/eller cellulas. 30

0548228

1/9

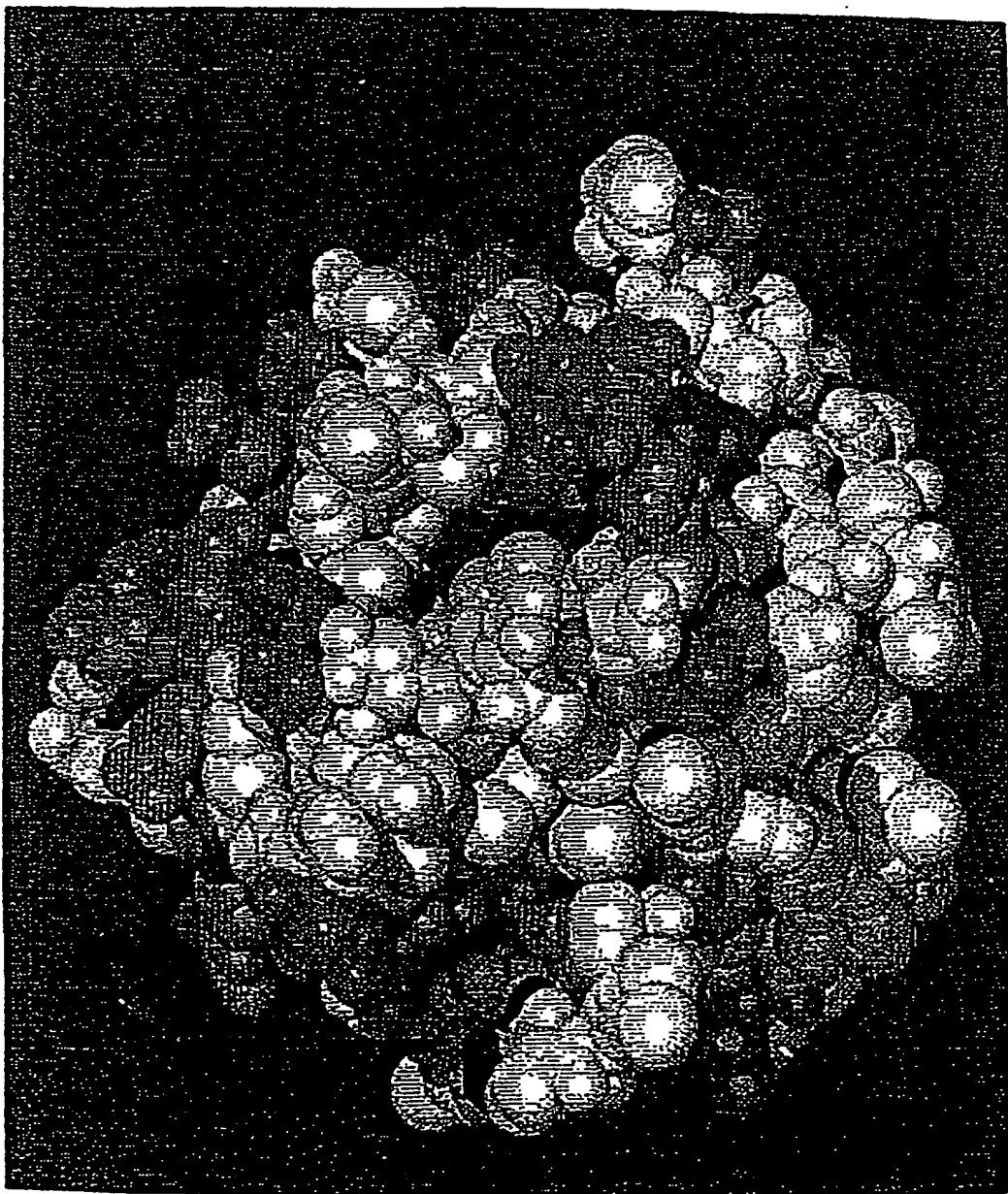


Fig. 1a

NZAS-0027074

0548228

2/9

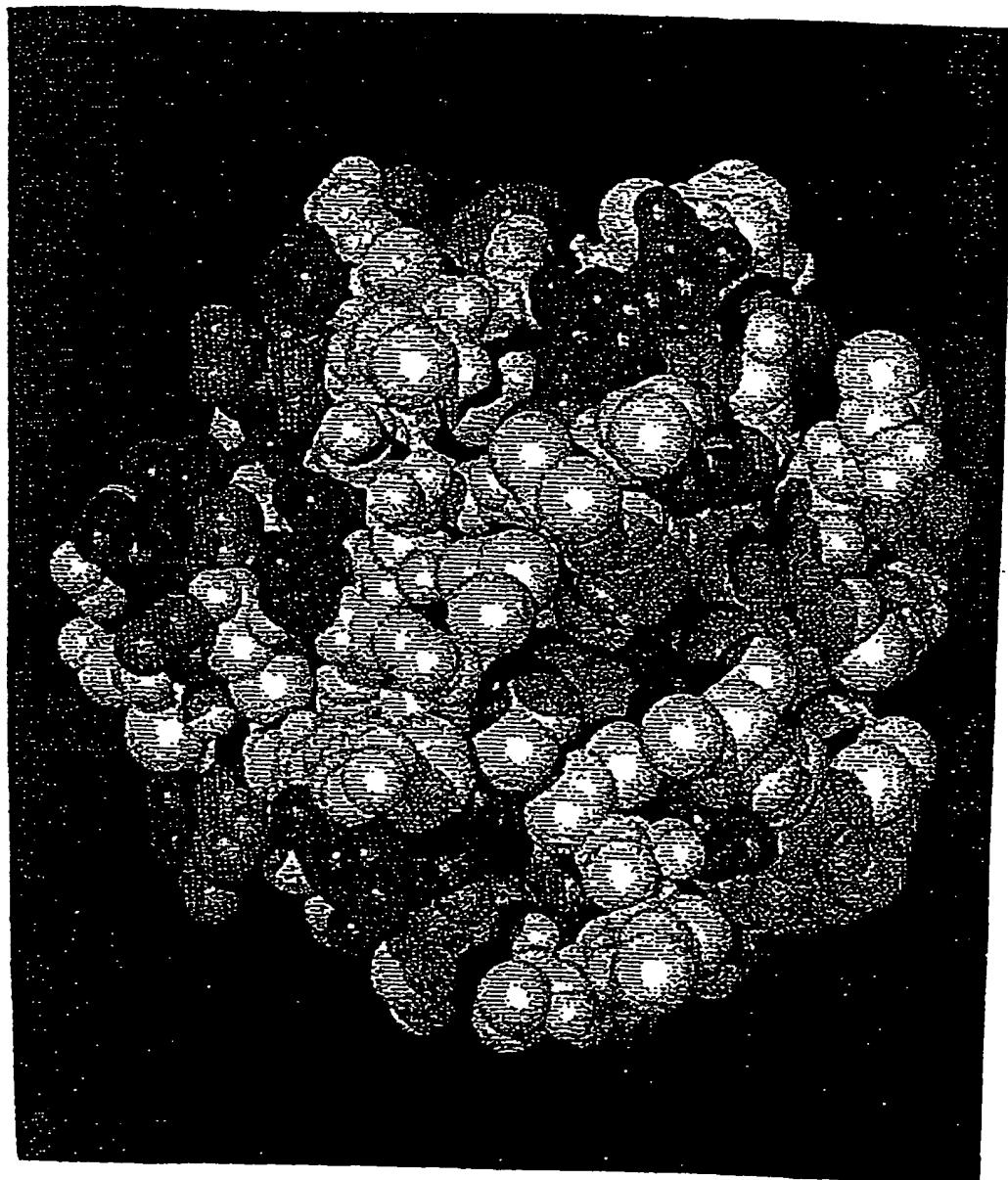


Fig. 1b

NZAS-0027075

0548228

3/9

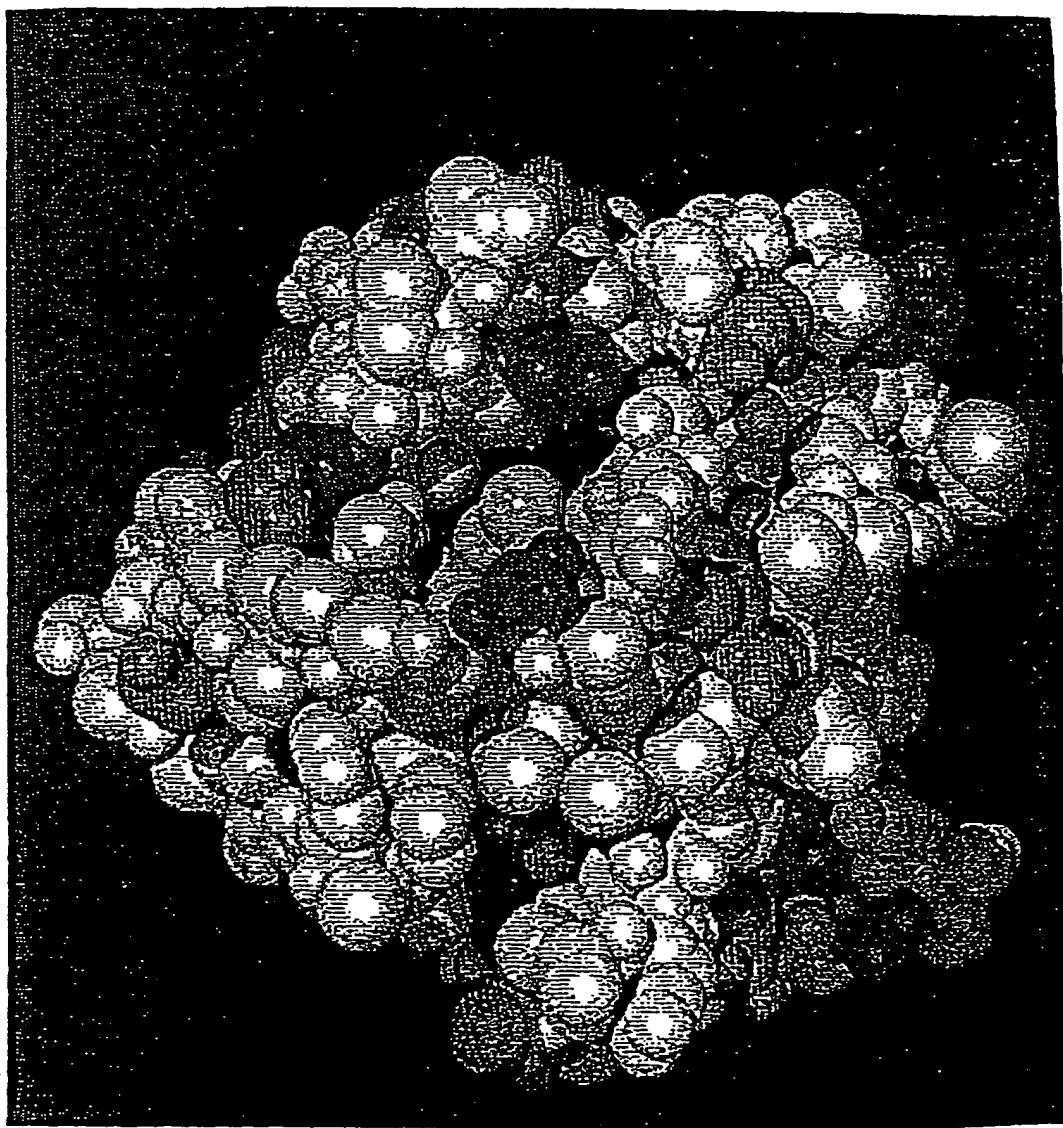


Fig. 2a

NZAS-0027076

0548228

4/9

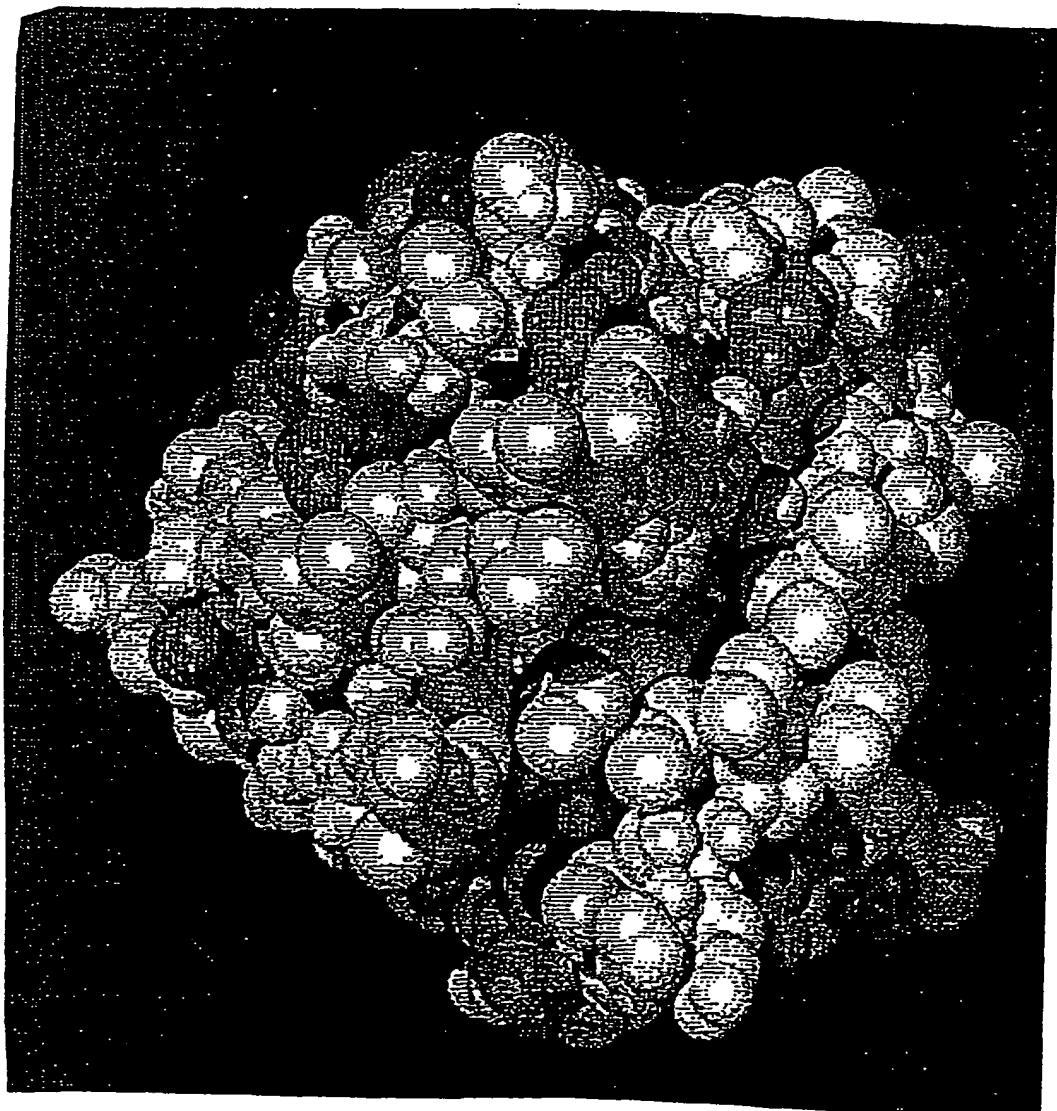


Fig. 2b

NZAS-0027077

5/9

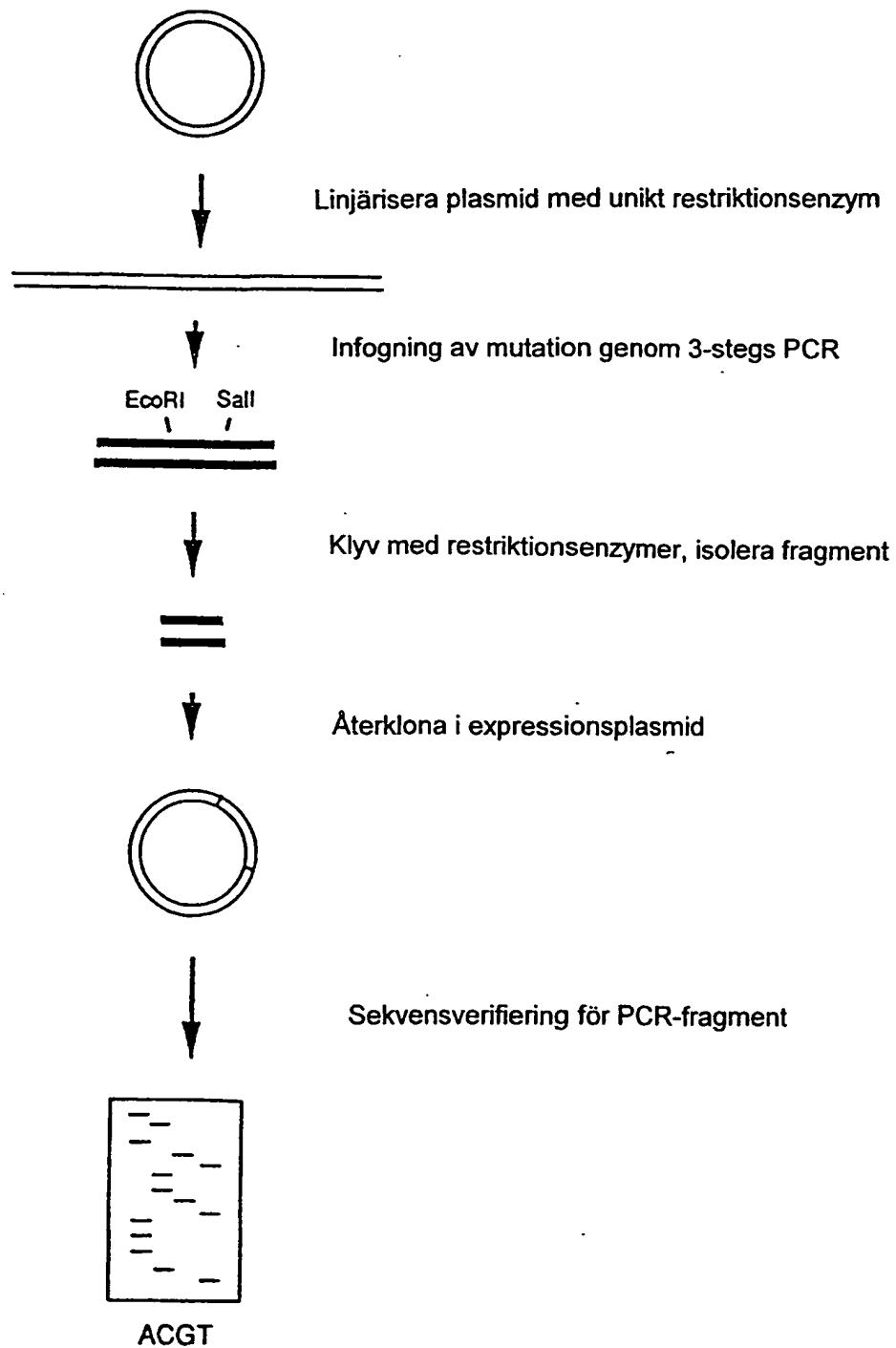


Fig. 3

6/9

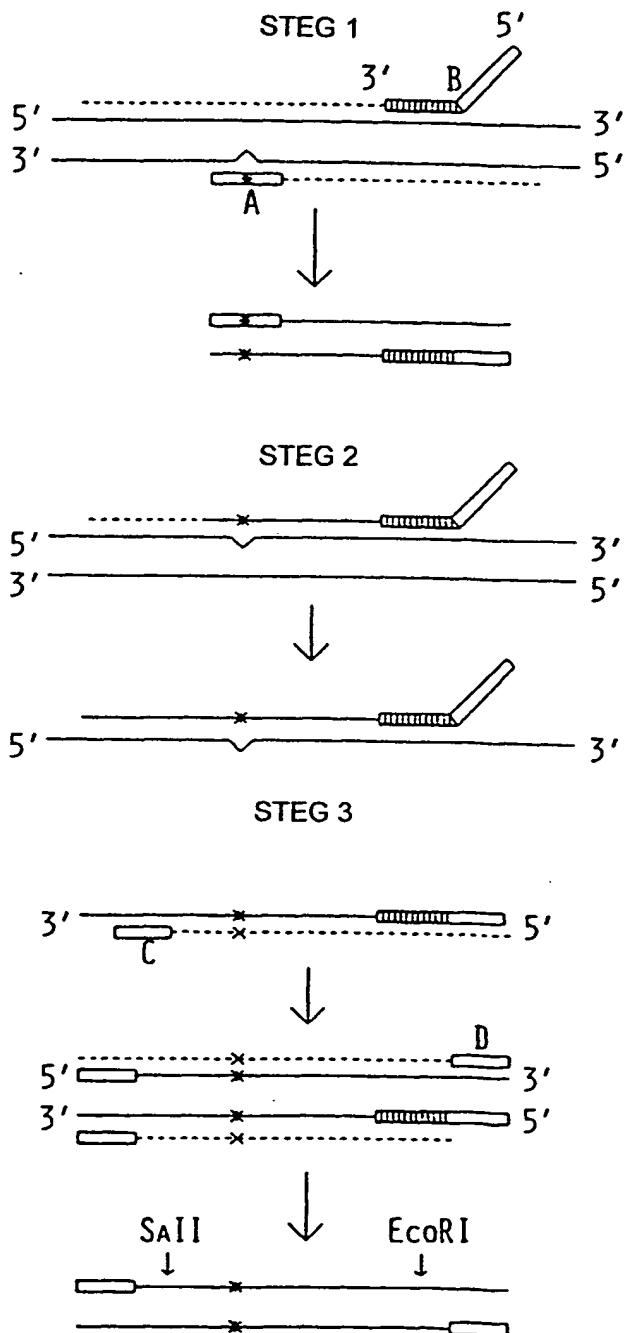


Fig. 4

7/9

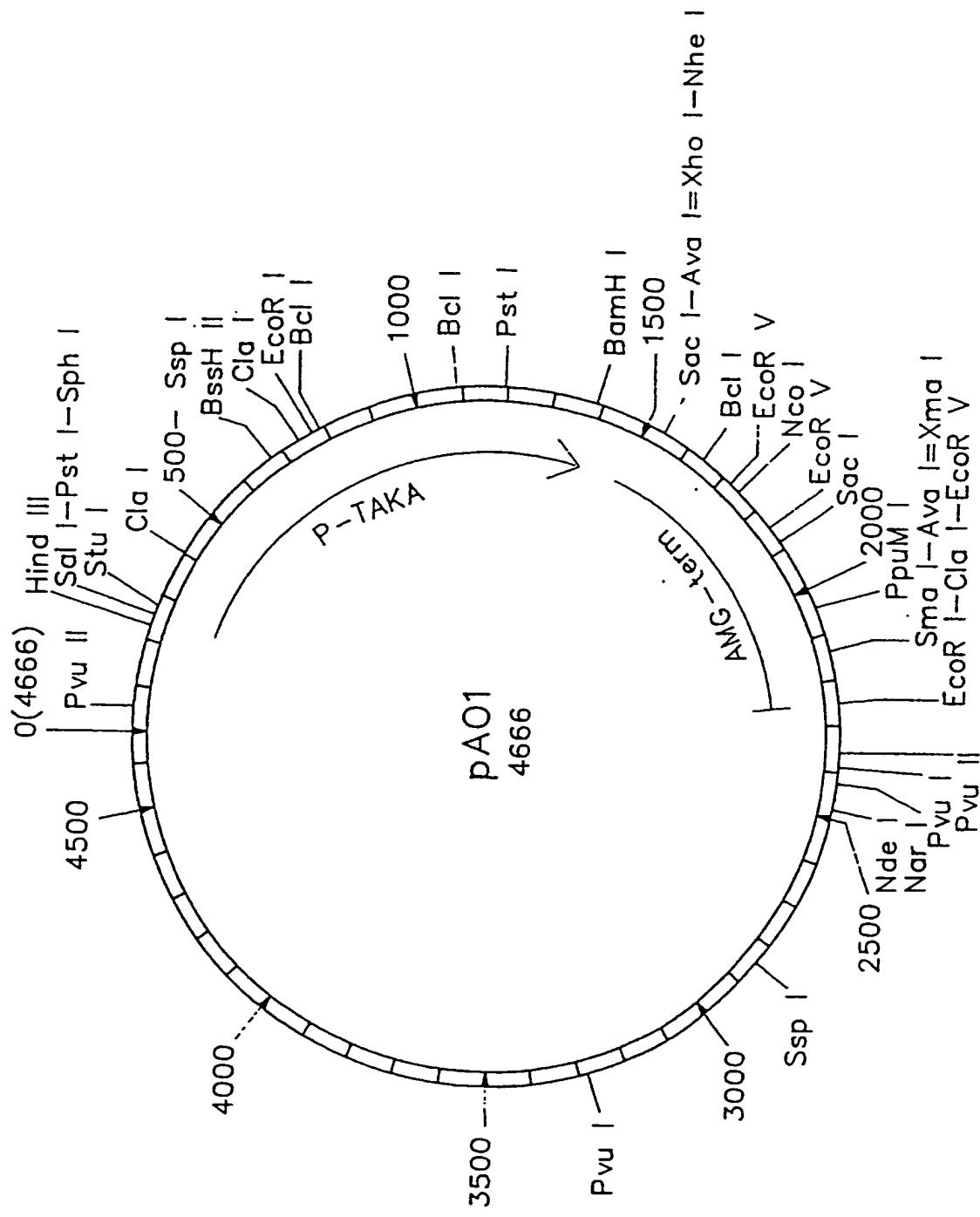


Fig. 5

0548228

8/9

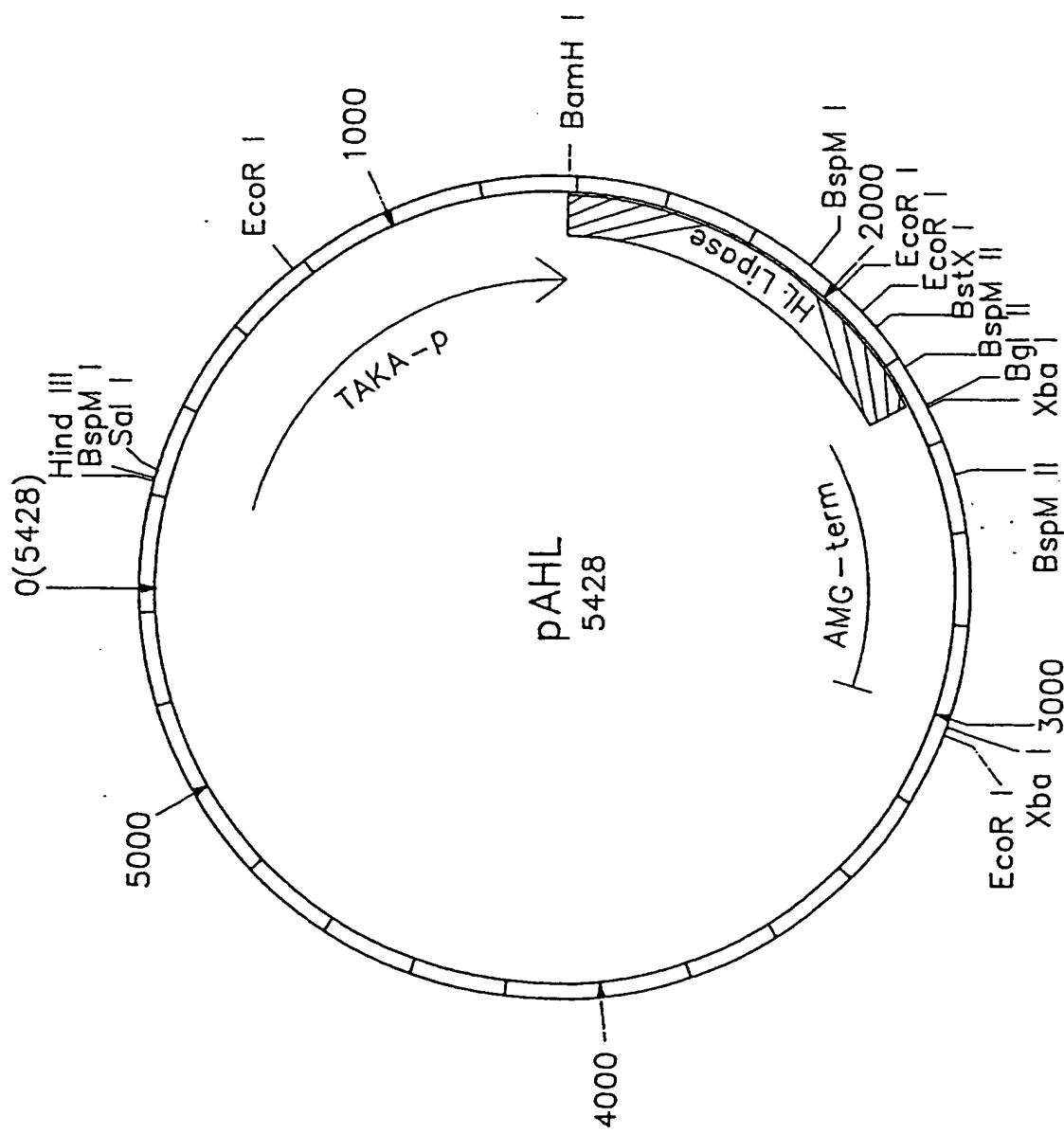


Fig. 6

NZAS-0027081

9/9

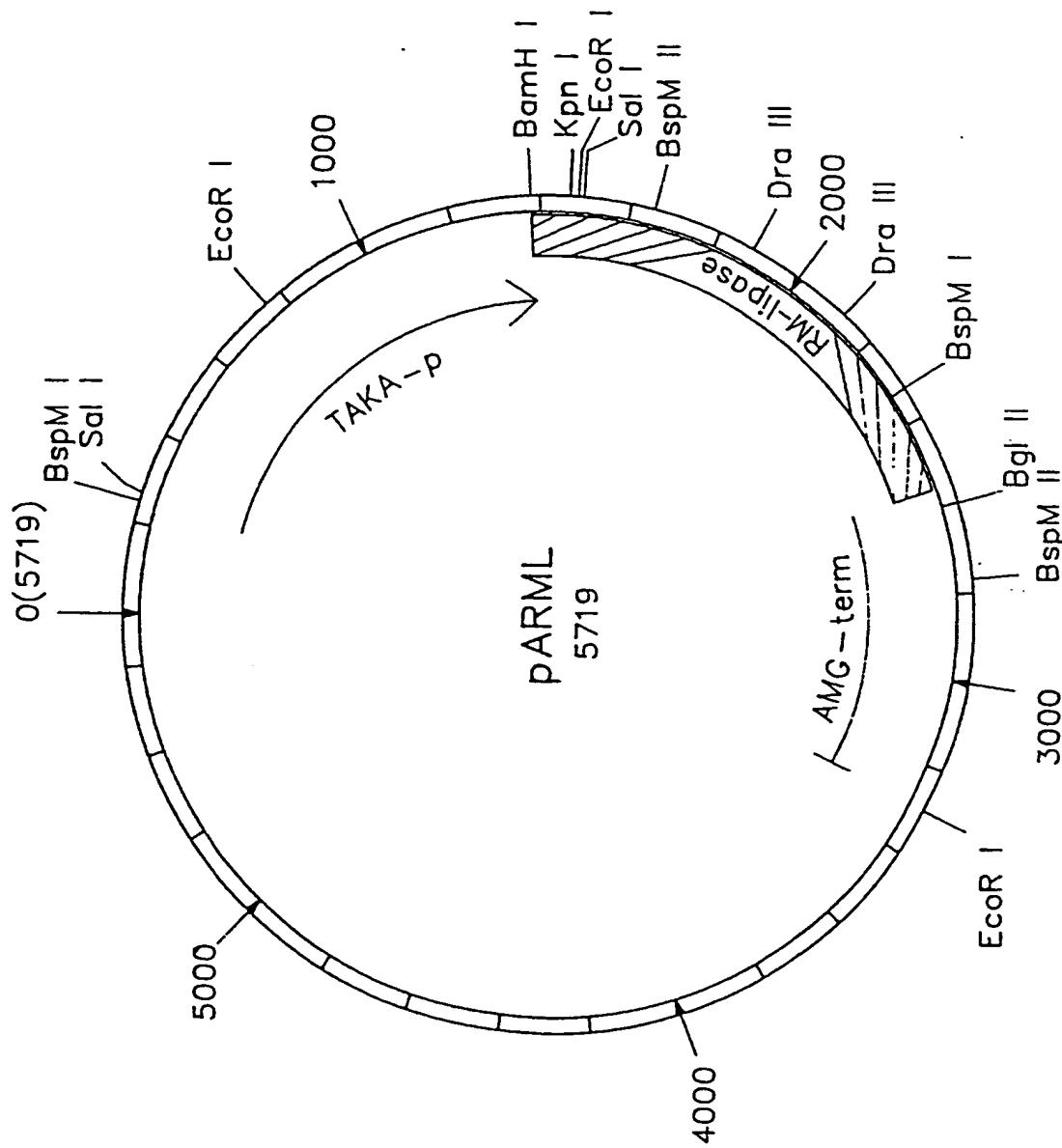


Fig. 7